N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 8322

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

ES SCIENCES NATURELLES

présentée

à l'UNIVERSITE PARIS VI

par

Madame Marie-Françoise BAUDET

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la thèse : Recherches sur un déterminant antigénique lipoprotéique qui réagit avec une IgA kappa monoclonale : "le site Pg".

Soutenue le : 11 Mai 1973

devant la commission d'examen

MM. DERVICHIAN Président
BEAUMONT Examinateur
BUVET "
DUBERT Invité

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 8322

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

ES SCIENCES NATURELLES

présentée

à l'UNIVERSITE PARIS VI

par

Madame Marie - Françoise BAUDET

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la thèse : Recherches sur un déterminant antigénique lipoprotéique qui réagit avec une IgA kappa monoclonale : "le site Pg".

Soutenue le : 11 Mai 1973

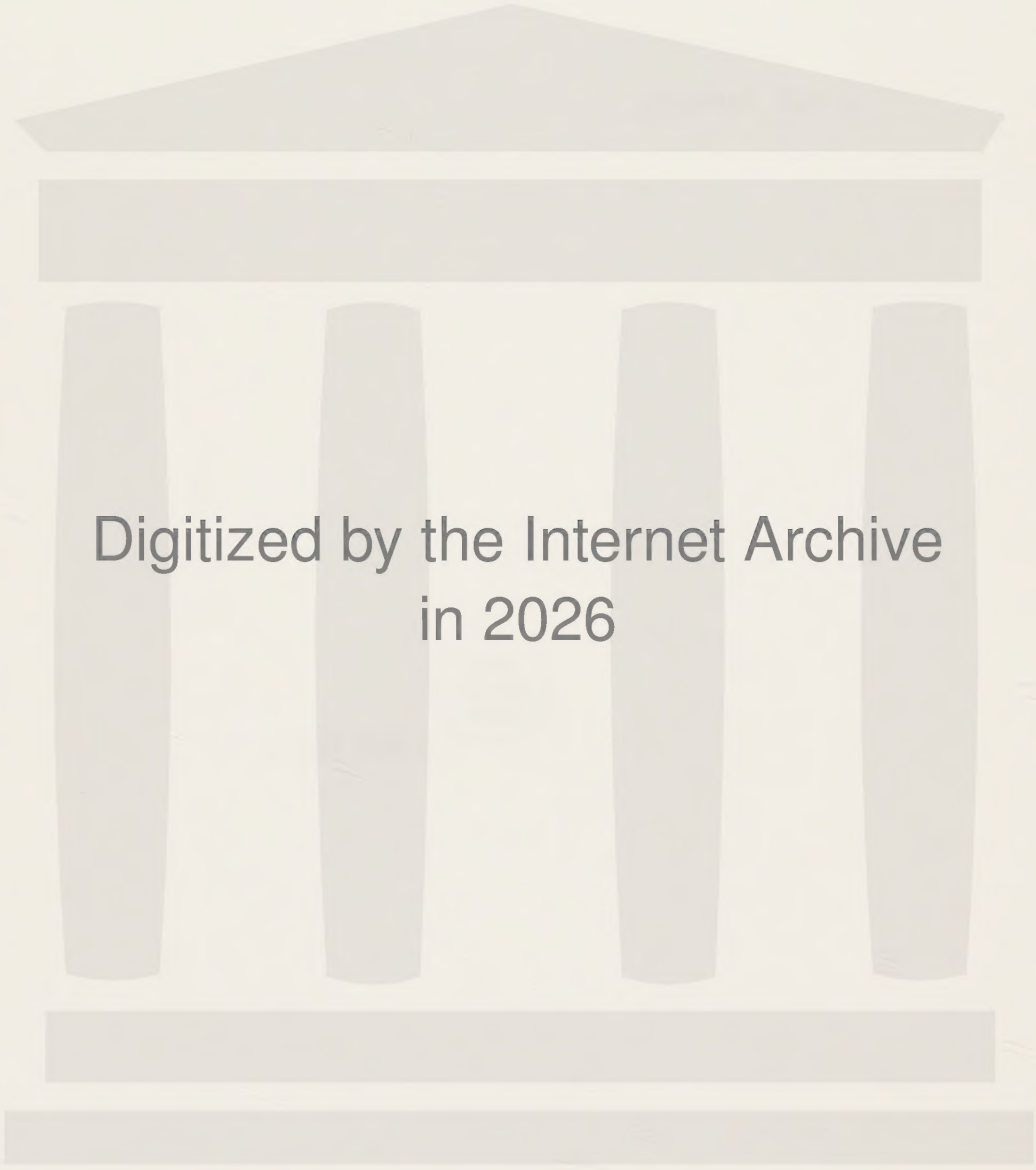
devant la commission d'examen

MM. DERVICHIAN Président
BEAUMONT Examinateur
BUVET "
DUBERT Invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MES PARENTS,

A MON MARI,


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548019_0014

A Monsieur le Professeur DERVICHIAN, qui m'a fait l'honneur de présider cette thèse.

A Messieurs les Professeurs BUVET et DUBERT, qui ont accepté de faire partie de mon jury et ont examiné ce travail avec une bienveillante attention,

j'adresse mes respectueux remerciements.

A Monsieur le Professeur J. L. BEAUMONT, qui m'a confié ce travail et me faisant profiter de sa grande expérience et de ses conseils a dirigé mes recherches et contribué à la présentation de mes résultats,

qu'il trouve ici l'assurance de ma reconnaissance et de mon respectueux attachement

A Madame M. AYRAULT-JARRIER, pour les conseils qu'elle m'a donnés,

j'adresse le témoignage de ma reconnaissance.

A tout le personnel du laboratoire,

avec mon amitié ;

Je remercie tout particulièrement Madame GHEMBAZA qui a réalisé la mise en page de mon manuscrit.

Ce travail a été réalisé dans l'Unité de Recherches sur l'Athérosclérose de l'I.N.S.E.R.M., au C.H.U. Henri-Mondor de Créteil.

SOMMAIRE

Pages

CHAPITRE I : GENERALITES

A. Introduction 1

B. Rappel de quelques définitions 3

C. Les immunoglobulines sériques 5

I. - Les immunoglobulines sériques normales 5

II. - Les immunoglobulines monoclonales 10

D. Les lipoprotéines plasmatiques 16

I. - Caractères généraux 16

1° Classification des lipoprotéines 16

a) Les chylomicrons 16

b) Les V.L.D.L. 18

c) Les L.D.L. 18

d) Les H.D.L. 19

2° Structure des lipoprotéines 20

II. - L'antigénicité des beta-lipoprotéines 21

CHAPITRE II : MATERIEL D'ETUDE ET REACTIFS

I. Les réactifs biologiques 23

1° Les immunoglobulines monoclonales 23

a) Définition du myélome 23

b) Les myélomes anti-Pg 23

...

Pages

IV. - Préparation et purification des beta-lipoprotéines sériques 33

V. - Préparation et purification des alpha-lipoprotéines sériques 33

VI. - Préparation du fragment Fab 34

VII. - Méthodes immunologiques 34

1° Electrophorèse en gel d'agarose 34

2° Electrophorèse sur acétate de cellulose 34

3° Electrophorèse sur gel d'amidon 34

4° Immuno-électrophorèse 34

5° Technique de double diffusion en gel d'agarose . . . 34

6° L'hémagglutination passive 34

7° L'agglutination d'émulsions lipidiques activées . . 36

VIII. - Dosage des protéines 41

B. Méthodes générales d'étude des lipides 41

I. - Méthodes d'extraction des lipides 41

1° Extraction par l'éther ou l'éther-méthanol à 0° C 41

2° Extraction par l'alcool-éther à - 20° C 41

II. - Technique de chromatographie sur couche mince 41

III. - Dosage du phosphore 43

IV. - Dosage du cholestérol 43

V. - Dosage des triglycérides 43

...

Pages

IV. - Préparation et purification des beta-lipoprotéines sériques 33

V. - Préparation et purification des alpha-lipoprotéines sériques 33

VI. - Préparation du fragment Fab 34

VII. - Méthodes immunologiques 34

1° Electrophorèse en gel d'agarose 34

2° Electrophorèse sur acétate de cellulose 34

3° Electrophorèse sur gel d'amidon 34

4° Immuno-électrophorèse 34

5° Technique de double diffusion en gel d'agarose . . . 34

6° L'hémagglutination passive 34

7° L'agglutination d'émulsions lipidiques activées . . 36

VIII. - Dosage des protéines 41

B. Méthodes générales d'étude des lipides 41

I. - Méthodes d'extraction des lipides 41

1° Extraction par l'éther ou l'éther-méthanol à 0° C 41

2° Extraction par l'alcool-éther à - 20° C 41

II. - Technique de chromatographie sur couche mince 41

III. - Dosage du phosphore 43

IV. - Dosage du cholestérol 43

V. - Dosage des triglycérides 43

...

Pages

CHAPITRE IV : DECOUVERTE, ISOLEMENT ET PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES MYELOMATEUSES

I. Propriétés du sérum entier 44

1° Existence de complexes dans le sérum 44

2° L'activité spécifique anti-lipoprotéines 46

II. Purification des IgA myélomateuses 47

III. Propriétés des IgA purifiées 51

1° Nature 51

2° Activité 53

a) Réactions secondaires 53

b) Réactions primaires 55

CHAPITRE V : LES LIPOPROTEINES REACTIVES L'ANTIGENE Pg

I. Préparation et purification des beta-lipoprotéines sériques 56

1° Précipitation par un polyanion 56

2° Chromatographie sur DEAE-cellulose 58

II. Préparation et purification des alpha-1-lipoprotéines sériques 58

1° Ultracentrifugation 63

2° Séparation des beta-lipoprotéines par précipitation . . 63

3° Chromatographie sur DEAE-cellulose 63

4° Filtration sur Séphadex G 200 64

III. Mise en évidence d'une spécificité commune aux alpha et beta-lipoprotéines sériques provenant d'un mélange de sérums . . . 64

1° L'IgA myélomateuse GER... a les caractères d'un anticorps anti-beta-lipoprotéine 64

...

Pages

2° La spécificité existant sur les beta-lipoprotéines existe aussi sur les alpha-lipoprotéines 68

IV. L'antigène Pg 72

CHAPITRE VI : MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE D'UN PHOSPHOLIPIDE DANS LE SITE Pg

I. Recherche de substances actives 74

II. Résultats 76

III. Conclusions 78

CHAPITRE VII : LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU FRAGMENT LIPOPROTEIQUE INHIBITEUR

I. Méthodes 81

1° Préparation de la fraction inhibitrice 81

2° Etude de la fraction inhibitrice 82

3° Détection du site Pg 82

II. Extraction de fractions inhibitrices à partir de beta-lipoprotéines purifiées 83

1° Influence du solvant 83

a) Extraction par l'éther seul 83

b) Extraction par des mélanges éther-méthanol 84

2° Influence de divers paramètres sur l'extraction par l'éther seul 86

a) Le pH d'extraction 86

...

Pages

b) La molarité du milieu d'extraction 86

c) La température d'extraction 86

d) La durée du contact entre la solution de beta-lipoprotéines et l'éther 86

III. Stabilité du pouvoir inhibiteur 86

1° Stabilité du pouvoir inhibiteur de la solution de beta-lipoprotéines 86

a) Action de la température sur la solution de beta-lipoprotéines avant l'extraction 86

b) Action de l'urée, du mercapto-éthanol, de l'oléate de soude sur la solution de beta-lipoprotéines 91

2° Stabilité du pouvoir inhibiteur de la fraction inhibitrice isolée 91

a) Action de la température 91

b) Conservation de la fraction inhibitrice 91

c) Action du pH sur la conservation de la fraction inhibitrice 91

IV. Composition de l'inhibiteur extrait à partir des beta-lipoprotéines par l'éther 91

1° Gel-filtration 91

2° Chromatographie en couche mince 92

3° Délipidation par l'éthanol-éther à - 20° C 92

a) Les peptides 92

b) Les lipides 92

...

Pages

V. Action inhibitrice des phospholipides du commerce 93
1° Les préparations commerciales 93
2° Les phospholipides obtenus en chromatographie en couche mince 93
VI. Action de quelques protéases sur le pouvoir inhibiteur de la beta-lipoprotéine ou du fragment inhibiteur extrait par l'éther 94
1° Sur la beta-lipoprotéine entière 94
2° Sur le fragment inhibiteur 94
VII. Conclusions 94

CHAPITRE VIII : LES INTERACTIONS MOLECULAIRES PRIMAIRES ENTRE IMMUNOGLOBULINES MYELOMATEUSES ET LIPOPROTEINES : EVALUATION DU NOMBRE DE SITES Pg PRESENTS SUR LES LIPOPROTEINES ET REAGISSANT AVEC LES SITES ANTI-Pg PRESENTS SUR LES IgA MYELOMATEUSES

I. Préparation du fragment Fab 97
1° Digestion par la papaïne 98
2° Filtration sur gel de Séphadex 98
3° Séparation des fragments Fab et Fc 99
II. Protocole expérimental et méthode de calcul 99
1° Protocole expérimental 99
2° Méthode de calcul 103
III. Résultats 103
IV. Conclusions 113

CHAPITRE IX : COMMENTAIRES 118

CHAPITRE I : GENERALITES

A. - INTRODUCTION

Dans certaines conditions, les anticorps peuvent être d'excellents outils pour connaitre les structures de la matière vivante. Ainsi, grâce à l'étude de l'activité des anticorps correspondants, de nombreux auteurs, parmi lesquels KABAT, RACE, SANGER, LLOYD, WATKINS, MORGAN, LINCOLN, BALDO (1 à 12), ont découvert au cours des vingt dernières années une grande partie des antigènes des groupes sanguins. C'est sur la haute spécificité de la réaction antigène-anticorps que repose ces études de structure. Les anticorps utilisés pour ce genre de travaux ne doivent donc pas être des mélanges d'anticorps, mais constituer au contraire une population homogène d'anticorps, quant à leur activité spécifique. Par conséquent, on ne peut pas s'adresser aux hétéro-anticorps obtenus par immunisation, car ce sont presque toujours des mélanges, mais on peut utiliser des anticorps "naturels" tels que ceux des groupes sanguins, qui correspondent à des sites isospécifiques, allotypiques, et qui paraissent beaucoup plus homogènes.

A ce titre, les protéines de myélome sont très intéressantes, car elles forment une population homogène d'anticorps. BEAUMONT ayant découvert en 1964 et 1965 deux protéines de myélome du type IgA κ, douées d'une activité spécifique anti-lipoprotéines (44, 45), nous avons pu entreprendre le présent travail.

...

Dans ce travail, nous nous sommes efforcés de mettre en évidence la nature, les caractéristiques physico-chimiques et la répartition à la surface de la molécule de lipoprotéine, d'un déterminant antigénique : le site Pg, révélé par ces deux immunoglobulines monoclonales IgA κ qui réagissent avec lui comme des auto-anticorps anti-Pg.

Nous examinerons successivement le matériel d'étude utilisé, les méthodes employées, l'isolement et la purification des immunoglobulines myélomateuses, les lipoprotéines réagissant avec ces immunoglobulines.

Nous étudierons ensuite la nature du site Pg, ses caractéristiques physico-chimiques et, enfin, sa distribution à la surface des lipoprotéines.

B. - RAPPEL DE QUELQUES DEFINITIONS

Un anticorps est une immunoglobuline douée d'une activité à la fois spécifique et considérable et qui, purifiée, garde toute son activité. La majorité des immunologistes considèrent aujourd'hui, à la suite de BURNET (13) et WALDENSTROM (14), que toutes les immunoglobulines normales, même si elles sont apparemment dépourvues d'activité anticorps, sont des anticorps potentiels dirigés contre des antigènes non connus de l'observateur. Selon leur concentration dans le milieu et leur qualité, les anticorps peuvent ou non précipiter en présence d'antigène.

Un site anticorps est la zone relativement restreinte de la molécule d'anticorps par laquelle ce dernier se combine avec la zone restreinte homologue et complémentaire de l'antigène, appelée déterminant antigénique. L'estimation indirecte des dimensions des sites anticorps a été faite par des expériences d'inhibition de précipitation ou par des expériences d'évaluation des constantes d'affinité avec des antigènes ou des haptènes dont le déterminant est connu avec exactitude (KABAT, 15). Le site anticorps est localisé dans la région N-terminale des immunoglobulines. Le fragment Fc a perdu toute propriété anticorps. La plus petite sous-fraction possédant un site anticorps intact est représentée par le fragment Fab ou le fragment Fab'.

Un antigène est une espèce moléculaire définie par sa spécificité antigénique.

La spécificité antigénique est la capacité de réagir avec une population d'anticorps, c'est-à-dire avec un groupe hétérogène d'anticorps.

...

Un motif antigénique est l'ensemble des structures responsables de la spécificité antigénique. Il est formé de déterminants antigéniques.

Un déterminant antigénique ou site antigénique est la structure complémentaire et homologue du site anticorps.

C. - LES IMMUNOGLOBULINES SERIQUES

I. - Les IMMUNOGLOBULINES SERIQUES NORMALES

Ce sont les protéines responsables de la fonction anticorps (16). Les immunoglobulines se divisent en 5 classes dont la répartition varie avec la race, le sexe, ... : ce sont les IgA, les IgG, les IgM, les IgD et les IgE ; les trois premières étant les plus importantes.

Ces classes se subdivisent en sous-classes :

- IgA_1 et IgA_2 pour les IgA
- IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4 pour les IgG
- IgM_1 et IgM_2 pour les IgM.

Leur poids moléculaire varie en fonction de leur teneur en carbohydrates et de leur degré de polymérisation.

Une molécule d'immunoglobuline est composée de 4 chaines : 2 chaines polypeptidiques légères (chaines L) dont le poids moléculaire est de 20 000 et 2 chaines polypeptidiques lourdes (chaines H), reliées entre elles par des ponts disulfures (Fig. 1) et dont le poids moléculaire varie de 50 000 à 70 000 (17, 18, 19).

Chaque classe d'immunoglobuline est déterminée par ses chaines lourdes qui sont de type α pour les IgA, γ pour les IgG, μ pour les IgM, δ pour les IgD et ε pour les IgE (20, 21).

Les chaines légères sont communes à toutes les classes d'immunoglobulines et sont définies antigéniquement comme appartenant à deux types chez les humains et chez de nombreux autres mammifères (22, 23) : le type κ que

...

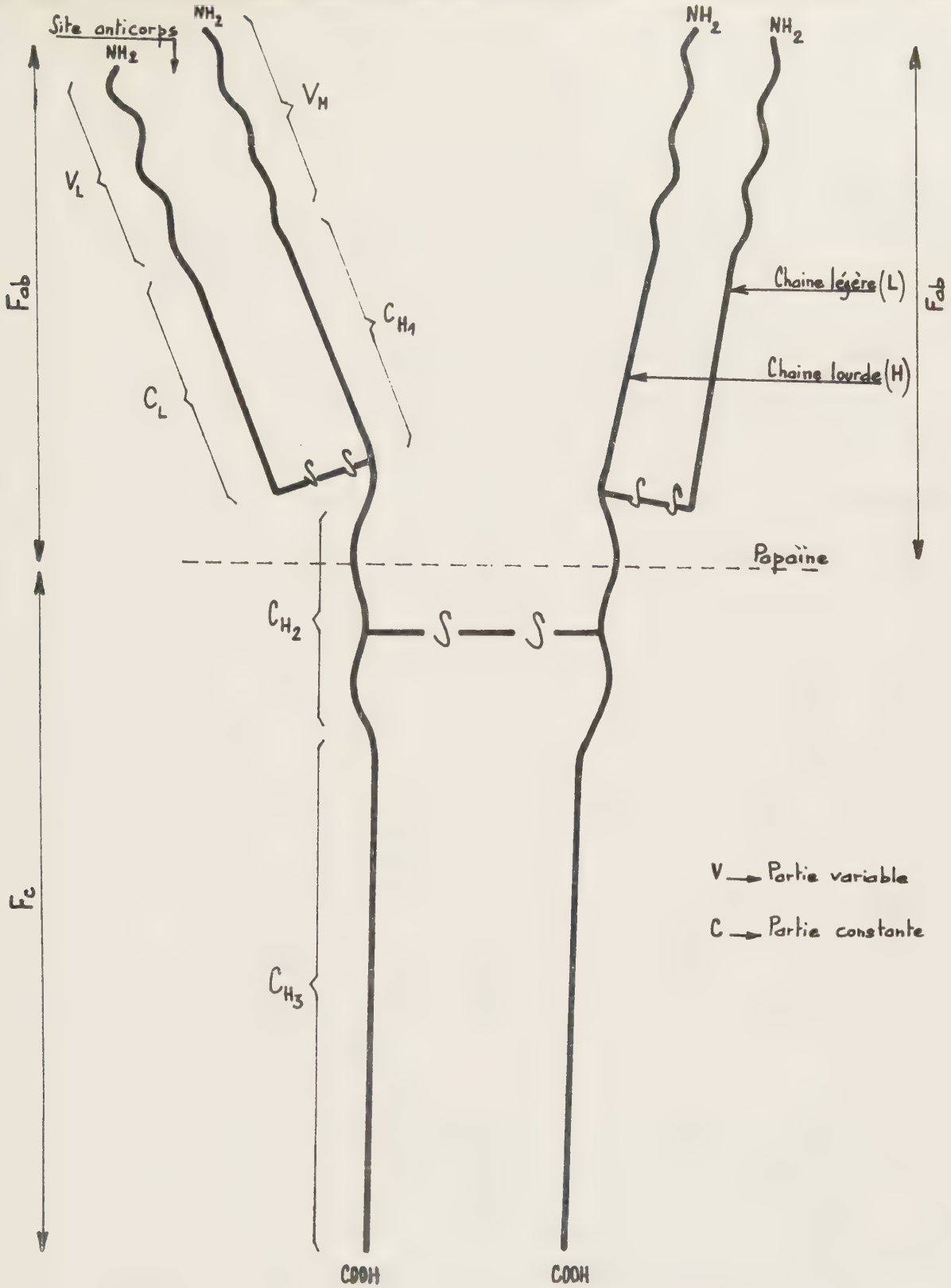


Fig. 1 : Schéma d'une immunoglobuline (tiré du cours de Monsieur RAYNAUD dans "Cours d'Immunologie Générale et de Sérologie de l'Institut Pasteur").

l'on rencontre dans 65 % des cas dans le sérum humain et le type λ_1 ou λ_2 que l'on rencontre dans 35 % des cas (Tableau I).

Les premiers travaux sur les séquences d'acides aminés des immunoglobulines (24, 25, 26) ont été faits grâce à la découverte dans l'urine d'un patient atteint de myélome, d'une protéine anormale : la protéine de Bence Jones. Cette protéine correspond aux chaines légères des immunoglobulines myélomateuses. Ces travaux ont beaucoup progressé grâce à l'étude des myélomes et des macroglobulinémies de Waldenström, qui représentent une population homogène de protéines. Ils ont permis de déterminer l'existence de parties variables et de parties constantes sur les chaines lourdes comme sur les chaines légères, de faire une analyse séquentielle des acides aminés de ces chaines (COHEN, 27 ; EDELMAN, 28 ; PUTNAM, 29 ; PORTER, 30) et de mettre en évidence la grande hétérogénéité de la structure primaire des immunoglobulines.

La structure des immunoglobulines a également été mieux connue grâce à la coupure des liaisons peptidiques de la molécule par des enzymes protéolytiques, comme la papaïne (PORTER, 31) qui, en présence de cystéine, permet d'obtenir trois fragments :

- deux fragments identiques, les fragments Fab comprenant chacun une chaine légère et la partie amino-terminale d'une chaine lourde. La partie responsable de l'union de l'immunoglobuline et de l'antigène, union très forte mais non covalente, se trouve à l'extrémité amino-terminale variable des chaines légères.

- un fragment Fc qui est composé des parties carboxy-terminales constantes des deux chaines lourdes, reliées entre elles par des ponts disulfures.

...

TABLEAU I

CARACTERISTIQUES des DIFFERENTES IMMUNOGLOBULINES

	IgG ou γG	IgA ou γA	IgM ou γM	IgD ou γD	IgE ou γE
Poids moléculaire de la protéine	150 000	180 000 à 500 000	900 000 (5 x 180 000)	170 000	196 000
Chaine lourde	γ	α	μ	δ	ε
Formule moléculaire	$\kappa\,\gamma$ ou $\lambda\,\gamma$	$\kappa\,\alpha$ ou $\lambda\,\alpha$	$\kappa\,\mu$ ou $\lambda\,\mu$	$\kappa\,\delta$ ou $\lambda\,\delta$	$\kappa\,\varepsilon$ ou $\lambda\,\varepsilon$
Sous-classes	IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4	IgA_1, IgA_2	IgM_1, IgM_2	-	-

Si l'on considère la structure des IgG, par exemple, on a pu montrer que :

- une chaine légère donnée a un nombre à peu près fixe d'acides aminés (214 en moyenne) ; elle comprend une moitié amino-terminale (jusqu'à l'acide aminé 107) de structure très variable, surtout entre les acides aminés 30 et 100, et une moitié carboxy-terminale de structure presque constante pour toutes les chaines du même type (κ ou λ).

- une chaine lourde comporte environ 440 acides aminés et comprend aussi deux régions : le quart amino-terminal qui est variable et le reste de la chaine qui est constant.

Dans la partie Fab de la molécule d'immunoglobuline, il y a une homologie très nette entre chaine lourde et chaine légère.

D'autre part, on a montré que toutes les immunoglobulines contiennent des oligosides qui, en règle générale, sont fixés sur la partie Fc des chaines lourdes.

Jusqu'au début du siècle, on pensait que la production d'anticorps était un moyen de défense de l'organisme contre une agression extérieure, ce qui est le processus de l'immunisation. Mais la découverte d'anticorps se développant contre des antigènes appartenant à l'organisme lui-même, amena à la conception du processus d'auto-immunisation (32). Ce phénomène est défini par trois types principaux de réactions, suivant qu'elles s'adressent soit à l'auto-antigène en cause, soit au système immunitaire du sujet, soit aux deux à la fois (50).

Dans certains cas précis, la formation d'auto-anticorps donne lieu à des phénomènes pathologiques, par exemple, quand les auto-anticorps réagissent

...

avec des constituants endogènes situés dans les organes ou dans les tissus accessibles à la circulation sanguine.

Les immunoglobulines étant très abondantes dans les affections myélomateuses et dans les macroglobulinémies de Waldenström, il était intéressant de chercher si ces protéines avaient une activité anticorps contre des antigènes d'origine exogène ou endogène. De la théorie de Burnet (13) découle l'idée que les immunoglobulines de myélome produites en dehors de toute stimulation antigénique peuvent être des anticorps. Cette activité anticorps a été prouvée vis-à-vis d'antigènes très variés par de nombreux auteurs, après avoir été déjà soupçonnée dès 1961 par Waldenström et par Kritzmann (14, 33).

II. - Les IMMUNOGLOBULINES MONOCLONALES

Les immunoglobulines monoclonales représentent une population d'immunoglobulines définies par leur homogénéité moléculaire, qui s'oppose à l'extrême hétérogénéité des immunoglobulines normales. Elles se rencontrent surtout au cours des myélomes, des macroglobulinémies de Waldenström chez l'homme et des myélomes multiples chez les souris BALB/C chez lesquelles on a pu induire des myélomes (34).

Ces immunoglobulines sont parfois désignées sous le nom de paraprotéines, mais ce terme convient mal, puisque ces immunoglobulines sont normales. On lui préfère en général celui de "protéines M" (35). Les protéines M possèdent la même chaine lourde H et la même chaine légère L, et elles peuvent ainsi être typées par des méthodes immunologiques, en ce qui concerne leur classe, leur sous-classe et leur type de chaine légère.

Ces immunoglobulines ont une antigénicité et une structure identiques.

...

De cette structure résulte une identité de charge électrique, qui se traduit électrophorétiquement par un pic étroit et élevé (36), contrastant avec le caractère diffus de la tache d'immunoglobulines provenant d'un sérum normal. On observe très souvent des réactions sérologiques très pauvres en même temps qu'une grande quantité de protéines M dans un sérum. Fréquemment, la capacité de produire des anticorps parait réduite (37) et presque toujours la protéine M semble dénuée d'activité.

Depuis longtemps, périodiquement, on pouvait voir des travaux concernant l'activité anticorps des protéines M (33, 38), mais ce n'est que depuis quelques années que l'activité anticorps de certaines immunoglobulines monoclonales chez l'homme et chez la souris a été indiscutablement reconnue (39).

Dans certains cas, Waldenström (14, 35, 40) avait trouvé des activités sérologiques singulières par leurs titres élevés, dépassant 1/250 000 et parfois $1/10^6$, et par leur spécificité inattendue, apparemment indépendante de toute stimulation antigénique : activité anti-streptolysine ou anti-thyroglobuline autologue dans des IgG myélomes. Il est établi maintenant que les activités de ces protéines M sont des activités anticorps. On a pu de même attribuer à une activité anticorps les propriétés de certaines IgM monoclonales, surtout dans des cas où la molécule se comportait comme un facteur rhumatoïde (33, 35), une agglutinine froide (35, 41, 42), un inhibiteur du facteur anti-hémophilique A (43).

On connait aussi les propriétés anticorps anti-lipides ou anti-lipoprotéines de plusieurs immunoglobulines de myélome : - chez l'homme, l'IgA κ anti-Lp P.G. ; l'IgG κ anti-Lp Al.Sa. qui produisent une hyperlipidémie (44, 45, 46) et plus récemment décrite, une IgA κ qui réagit avec la portion

protéique des lipoprotéines et s'accompagne d'une hypolipidémie (48).
- Chez la souris, plusieurs molécules anti-phospholipides (34, 49).

L'activité anticorps de ces protéines M est portée par le fragment Fab de la molécule, liée stoechiométriquement au nombre de paires de chaines lourdes et de chaines légères présentes dans le milieu, hautement spécifique et considérable. Elle peut être précipitante ou non.

Après purification, les protéines M sont aussi actives, sinon plus que les autres anticorps connus.

Les immunoglobulines monoclonales constituent donc une population anormalement homogène d'immunoglobulines normales ayant souvent une activité anticorps démontrable.

L'étude de l'activité spécifique des protéines M présente un grand intérêt pour la conception de la théorie de production des anticorps : le fait, comme l'a remarqué Waldenström (35), qu'il n'y ait apparemment pas de stimulus antigénique et que dans certains cas la protéine M reconnaisse un antigène normalement présent chez le même individu et jusque-là masqué par la tolérance immunitaire, semble confirmer avec une précision étonnante la théorie de Burnet (51) pour qui la production d'anticorps résulte de la sélection clonale : apparue en l'absence de stimulus antigénique, l'activité de la protéine M révèle la pré-détermination du clone cellulaire qui la produit.

Les immunoglobulines monoclonales sont aussi un excellent outil d'étude des antigènes et par conséquent de la structure des protéines. Dans notre cas, par exemple, c'est grâce à l'immunoglobuline trouvée dans des IgA

...

myélomes que nous avons découvert la spécificité Pg, commune à toutes les lipoprotéines du sérum. Cette spécificité n'est ni isotypique, comme celles qui distinguent les lipoprotéines humaines et animales, ni allotypique . On la trouve chez de nombreux vertébrés, même inférieurs, et son origine semble être très antérieure à la différenciation de l'espèce humaine. Il pourrait s'agir d'un fragment d'une matrice commune aux lipoprotéines du sérum, auquel les groupements spécifiques de l'espèce et des individus sont venus s'ajouter.

L'antigène Pg qui est normalement toléré par les différentes espèces qui le possèdent, n'est pas reconnu par les anti-sérums couramment utilisés en immunologie et a échappé ainsi aux investigations antérieures. Il a été détecté grâce à une protéine M.

TABLEAU II

RECAPITULATION des PROTEINES M AYANT une ACTIVITE ANTICORPS chez l'HOMME

Auteurs	Date de publication	Maladie	Type de l'Ig		Activité
			Chaines lourdes	Chaines légères	
SELIGMANN, DANON MASCH, J. BERNARD	1968	Cryoglobulinémie	γ	κ	Antistreptolysine
ZETTERVALL O.	1968		γ	1 κ 1 λ	
KRONVALL	1967		γ	λ	
KRITZMAN, KUNKEL McCARTHY, MELLORS	1961	Macroglobulinémie	μ		Anti-γ G
HEIMER & NOSENZA	1965		μ	κ	
CURTAIN, BAUMGERTEN & PYE	1965	Cryoglobulinémie	μ		
STONE, METZGER	1968	Macroglobulinémie	μ	κ	
GREY, KOHLER, TERRY & FRANKLIN	1968	Cryoglobulinémie	γ	4 κ 1 λ	
FUDENBERG & KUNKEL	1957	Anémie hémolytique	μ		Agglutinines froides
HARBOE M.	1965		μ		
OZER & CHAPLIN	1963		μ		Anti-hématies vieillies
MILLER D.	1960	Macroglobulinémie	μ		Anti-héparine
BEAUMONT J. L. & LEMORT N.	1970	Myélome + hyperlipidémie + diabète	α	λ	
GISLER & PILLOT	1968	Macroglobulinémie + cryoglobulinémie	μ	λ	Anti-cardiolipide
EISEN, LITTLE, OSTERLAND, SIMMS	1968	Myélome	γ	κ	Anti-nitrophényl
ASHMAN & METZGER	1969	Macroglobulinémie	μ	κ	
ZETTERVALL O.	1968		γ	λ	Antistaphylolysine
BEAUMONT J.L.	1966	Myélome + hyperlipidémie	α	κ	Antilipoprotéine
BEAUMONT J. L.	1969		γ	κ	
NOSEDA, BUTLER, SCHLUMPF, BRUNNER & RIESEN	1971	Hypolipidémie	α	κ	
BEAUMONT J. L. (en cours)	1972	Macroglobulinémie	μ	κ	

TABLEAU II (Suite)

PROTEINES M AYANT une ACTIVITE ANTICORPS chez la SOURIS

Auteurs	Date de publication	Maladie	Type de l'Ig		Activité
			Chaines lourdes	Chaines légères	
EISEN H.N., SIMMS E. S. & POTTER M.	1968	Myélome	α	κ	Antinitrophényl
POTTER M. & LEON M. A.	1968	Myélome	α	κ	Anti-C-polysaccharide

D. - LES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES

I. - CARACTERES GENERAUX (52, 53)

Les lipoprotéines plasmatiques constituent un groupe particulier de macromolécules. Les lipides étant insolubles en solution aqueuse, les lipoprotéines jouent un rôle spécifique dans la solubilisation et le transport des lipides à travers le plasma, à partir des lieux d'absorption des lipides vers leurs points de stockage et de catabolisme.

Les lipides sont liés aux lipoprotéines sous forme d'associations moléculaires, découvertes par Macheboeuf en 1928 (54) et appelées cénapses.

Les lipoprotéines sont spécifiques, immunologiquement distinctes des autres protéines plasmatiques et n'existent pas à l'état libre sans lipides.

1° Classification des lipoprotéines (Tableau III)

L'électrophorèse sur papier permet d'identifier quatre classes de lipoprotéines : les chylomicrons, les V.L.D.L. (very low density lipoproteins), les L.D.L. (low density lipoproteins) et les H.D.L. (high density lipoproteins)

a) Les chylomicrons : Ce sont les lipoprotéines de Sf $>$ 400. Ils sont synthétisés dans la muqueuse intestinale et servent au transport des triglycérides d'origine alimentaire de l'intestin vers la lymphe. Ils sont absents dans le plasma d'un sujet normal à jeun. Ils mesurent de 750 à 10 000 Å et ont un poids moléculaire de 10^3 à $10^4 \times 10^6$. En électrophorèse en gel d'agarose, ils restent à l'origine, mais en gel d'amidon ou en acétate de cellulose, ils migrent avec les VLDL. Ils contiennent peu de protéines (0,5 à 1 %),

...

TABLEAU III

CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES

Lipoprotéines	Sf*	Densité g/ml	Mobilité électrophorétique	Poids moléculaire	Taille en Å
Chylomicrons	> 400	< 0,95	origine	10^3-10^4 x 10^6	750 - 10 000
V.L.D.L.	20 - 400	0,95 - 1,006	pré-beta	5 - 10 x 10^6	300 - 800
L.D.L.	0 - 20 0 - 12	1,006 - 1,063 1,019 - 1,063	beta	2,1 - 2,6 x10^6	215 - 220
H.D.L.	-	1,063 - 1,21	alpha	200 000	75 - 100

* Sf : indice de flottaison des lipoprotéines en unités Sveldberg (10^{-13} cm/s/dyne/g) dans une solution de chlorure de sodium de densité 1,063 g/ml à la température de 26° C.

beaucoup de triglycérides (80 à 95 %), peu de phospholipides (3 à 15 %) et peu de cholestérol (2 à 12 %). Le mode d'union de la protéine aux lipides et son rôle dans le transport sont inconnus.

b) Les V.L.D.L. : Elles ont un Sf compris entre 20 et 400 et sont isolées en ultracentrifugation entre les densités 0,95 et 1,006. Ce sont des particules sphériques ayant un diamètre de 300 à 800 Å et un poids moléculaire de 5 x 10 x 10^6. Les VLDL sont synthétisées dans le foie et transportent les triglycérides d'origine endogène hors du foie. Leur catabolisme est mal connu. Elles sont pauvres en protéines (6 à 12 %). Les lipides les plus abondants sont les triglycérides (50 à 70 %). Il y a peu de phospholipides (15 à 25 %) et peu de cholestérol (10 à 25 %). En électrophorèse, elles migrent en position α_2 ou pré-β. Leur partie protéique contient les apoprotéines des LDL et des HDL, mais on a montré qu'il existait au moins trois autres peptides (55, 56). C'est cette catégorie de lipoprotéines qui augmente dans le sérum dans la période post-digestive.

c) Les L.D.L. : Elles ont un Sf de 0 à 20 et sont isolées en ultracentrifugation à une densité allant de 1,006 à 1,063, la plus grande partie étant isolée entre 1,019 et 1,063. Elles ont une molécule sphérique ayant un diamètre de 215 à 220 Å et un poids moléculaire de 2,1 à 2,6 x 10^6. Elles sont synthétisées dans la muqueuse intestinale et dans le foie. Leur catabolisme est mal connu. Les enzymes lipolytiques y jouent sûrement un rôle, mais le système réticulo-endothélial aussi. En immuno-électrophorèse, elles migrent en position β. Elles contiennent environ 20 à 25 % de protéines, 10 % de triglycérides, 25 % de phospholipides, 40 % d'esters de cholestérol

...

et 10 % de cholestérol libre. L'apoprotéine serait constituée de 2 chaines ayant un poids moléculaire de 200 000 et dont l'acide N-terminal est l'acide glutamique. Elle est très pauvre en acides aminés soufrés, mais ceci ne suffit pas à expliquer son association très spécifique avec les lipides.

La destruction des LDL par les protéases est très difficile. On connait mal la manière dont lipides et protéines sont liés. Triglycérides, esters du cholestérol et cholestérol sont facilement extractibles par l'éther à froid, par agitation ou par addition de détergent et extraction par l'éther sans agitation. Ces lipides sont liés aux phospholipides par les chaines hydrophobes. L'éther seul permet d'extraire 50 % des phospholipides. Pour extraire le reste des phospholipides, il faut ajouter à l'éther des quantités d'alcool qui dénaturent la protéine. Ceci laisse supposer l'existence de plusieurs types de liaisons entre les phospholipides et les protéines : des "cénapses" peu stables et des "cénapses" stables.

d) Les H.D.L. : Ce sont les plus petites et les plus denses des lipoprotéines. Elles ont un poids moléculaire moyen de 200 000 et un diamètre compris entre 75 et 100 Å. Elles sont isolées en ultracentrifugation à une densité comprise entre 1,063 et 1,21. Electrophorétiquement, elles migrent en position α -globulines. L'ultracentrifugation analytique a montré que les HDL étaient hétérogènes et on les classe souvent en HDL_2 (d = 1,063 à 1,12) et HDL_3 (d = 1,12 à 1,21). Elles sont synthétisées surtout dans le foie. Les HDL sont les lipoprotéines les plus riches en protéines (52 %). Elles contiennent beaucoup de phospholipides (30 %), peu d'esters de cholestérol (18 %) et très peu de triglycérides et de cholestérol libre. Les liaisons

...

unissant lipides et protéines sont sans doute des liaisons électro-valentielles et des liaisons entre chaines hydrophobes. Les lipides neutres sont liés à l'ensemble par l'intermédiaire des phospholipides.

2° Structure des lipoprotéines :

La structure des lipoprotéines est très complexe et ne fait encore à l'heure actuelle, que l'objet d'hypothèses. Dans le cas des LDL, la plupart des structures décrites jusqu'à présent (57, 58, 59) montraient un noyau lipidique entouré de protéines. Récemment (60), MATEU et coll. ont décrit une nouvelle structure. Les LDL seraient constituées d'une double couche de lipides, ayant un rayon de 65 Å , et la surface externe serait couverte de sous-unités protéiques à symétrie icosahédrale. La distribution des deux principales classes de lipides, phospholipides et esters du cholestérol, serait uniforme des deux côtés de la double couche lipidique. En outre, il semblerait que les sous-unités protéiques interfèrent avec une partie du cholestérol des esters du cholestérol et que, sur la face externe de la double couche lipidique, les groupes polaires des phospholipides soient orientés vers le solvant. Des arguments indirects suggéreraient que le centre de la molécule de LDL est occupé par un noyau protéique. La structure des VLDL reste encore plus hypothétique et aucun modèle ne peut être proposé actuellement.

Pour les HDL, on ne peut aussi faire que des hypothèses. Les faits expérimentaux montrent que l'on a peut-être affaire à une structure formée de plusieurs unités globulaires sans doute reliées entre elles par des lipides, les liens lipides-protéines étant probablement non polaires (61).

...

II. - L'ANTIGENICITE des β -LIPOPROTEINES :

On sait déjà depuis longtemps que certaines protéines présentent un polymorphisme génétique. SMITHIES (62), en 1955, a découvert le polymorphisme de l'haptoglobuline du sérum humain, GRUBB et LAURELL (63), en 1956, ont trouvé le polymorphisme des immunoglobulines. Depuis, plusieurs variations génétiques concernant diverses protéines sériques ont été décrites. C'est pourtant au cours des dix dernières années que des études sur le polymorphisme des β -lipoprotéines sériques de faible densité (LDL) ont été faites. Les premiers travaux sur les β -lipoprotéines sont dus à ALLISON et BLUMBERG en 1961 (64) : ils ont trouvé que le sérum d'un patient polytransfusé, C. de B. formait en gel d'agarose un arc de précipitation avec le sérum de certains sujets normaux. L'anticorps mis en cause était une γ -globuline 7S et l'antigène avec lequel il réagissait était une β -lipoprotéine de la classe des LDL. Le sérum de 55 % de la population des U.S.A. réagissait avec le sérum de C. de B. et cela a permis de penser que l'antigène qui réagissait était hérité. Cette spécificité a été appelée système Ag.

Depuis, plusieurs autres systèmes antigéniques ont été décrits sur la molécule de β -lipoprotéine :

- le système Ld par BERG et coll. (65) ;
- le système Lp par CONTU en 1966 (66, 67) ;
- le système Lt par BERG et BEARN en 1970 (68).

HIRSCHFELD et coll. (69, 70, 71, 72, 73), et BLUMBERG (74, 75, 76) ont aussi fait de nombreux travaux sur l'antigénicité de la β -lipoprotéine. Dans tous les cas, il s'agissait de spécificités allotypiques. On connait aussi

...

des spécificités isotypiques qui distinguent les β -lipoprotéines humaines des β -lipoprotéines animales.

Dans notre travail, nous n'avons étudié aucune de ces spécificités, mais une spécificité commune aux α et aux β -lipoprotéines sériques, qui existe chez de nombreux vertébrés, et dont l'origine encore imprécise, semble remonter à une étape de la phylogénèse très antérieure à celle de la différenciation de l'espèce humaine. Il s'agit d'une spécificité phylotypique.

CHAPITRE II :

MATERIEL D'ETUDE ET REACTIFS

Pour notre travail, nous avons employé deux sortes de réactifs :

- des réactifs biologiques,
- des réactifs chimiques.

I. - Les REACTIFS BIOLOGIQUES

Nous avons utilisé, d'une part, des immunoglobulines monoclonales, d'autre part, des lipoprotéines humaines et animales.

1° Les immunoglobulines monoclonales :

Il s'agit de deux immunoglobulines du type IgAκ, trouvées dans deux cas de myélomes, les myélomes anti-Pg étudiés dans notre laboratoire, et que nous allons décrire (Fig. 2, 3, 4 et 5).

a) Définition du myélome : C'est une maladie caractérisée par une prolifération plasmocytaire maligne, surtout médullaire, responsable de la production de lésions ostéolytiques et d'un pic d'immunoglobulines monoclonales.

b) Les myélomes anti-Pg : Les deux malades dont les sérums ont été étudiés dans notre laboratoire présentaient, associée à leur myélome de type anti-Pg, une importante hyperlipidémie. Il a été montré que ces deux facteurs étaient liés et que l'hyperlipidémie découlait de l'activité anti-lipoprotéines de l'immunoglobuline.

...

Fig. 2 : Lipidogramme en gel d'agarose
des sérums de myélomesétudiés.
Coloration au noir Soudan

1. Sérum témoin
2. Sérum GER...
3. Sérum SOR...

Fig. 3 : Electrophorèse en gel d'amidon des sérums de myélomes étudiés.

Coloration des protéines à l'amido-Schwartz.

1. Sérum témoin
2. Sérum GER...
3. Sérum SOR...

Fig. 4 : Idem.

Coloration des lipides à l'Oil Red.

Fig. 5 : Immuno-électrophorèse en agarose des sérums de myélomes étudiés, révélés par un antisérum humain normal. Coloration à l'amido-Schwartz.

De haut en bas : Sérum témoin

Sérum GER...

Sérum SOR...

Sérum témoin.

α) Monsieur GER... 58 ans, est suivi pour une hyperlipidémie avec xanthomatose et myélome multiple. L'hyperlipidémie est constante et fluctuante avec les chiffres suivants :

- cholestérol total : 400 à 900 mg/100 ml
- triglycérides : 180 à 1 440 mg/100 ml
- phospholipides : 400 à 900 mg/100 ml

Le sérum est laiteux. A l'analyse immuno-électrophorétique, la paraprotéine présente les caractéristiques d'une IgA.

β) Monsieur SOR... 62 ans, est suivi pour une hyperlipidémie avec xanthomatose et myélome multiple. L'hyperlipidémie est constante:

- cholestérol total : 770 à 1 120 mg/100 ml
- triglycérides : 430 à 1 350 mg/100 ml
- phospholipides : 290 à 670 mg/100 ml

Le sérum est laiteux. La paraprotéine en immuno-électrophorèse présente tous les caractères d'une IgA.

2° Les lipoprotéines

a) Les lipoprotéines humaines :

- Les lipoprotéines normales ont été préparées à partir de sérums provenant du Laboratoire d'Analyses de l'Hôpital Boucicaut.

- Les lipoprotéines xanthomateuses ont été préparées à partir de sérums provenant de patients du Service de Médecine Interne de l'Hôpital Henri-Mondor à Créteil.

b) Les lipoprotéines animales : Elles ont été préparées à partir de sérums provenant soit de notre laboratoire, soit des Laboratoires SORGA.

...

II. - Les REACTIFS CHIMIQUES

1° Tampons : toutes les solutions tampons contenaient de l'azoture de sodium PROLABO à la concentration de 1 p. 1 000.

- Tampon véronal : 1 volume de solution A de Michaelis (147,45 g de véronal sodé + 97,15 g d'acétate de sodium) + 9 volumes de NaCl à 9 p. 1 000.

- Tampon phosphate monosodique (MERCK) P.M. : 137,99 ; pH 6,5.

- Tampon phosphate (phosphate disodique 42,2 g, phosphate monopotassique 4,39 g, eau q.s.p. 1 000 ml).

- Tampon phosphate E.D.T.A. : A. 9,078 g H_2KPO_4, eau q.s.p. 1 000 ml ; B. 11,872 g $HNa_2PO_4 2H_2O$, eau q.s.p. 1 000 ml (61 ml B + 39 ml A = pH 7). A 100 ml de ce mélange ajouter 0,0744 g d'E.D.T.A. et 0,4 387 g de NaCl.

- Tampon Tris (MERCK)

- Tampon glycocolle : A. NaOH 0,1 N ; B. glycocolle 7,5 g, NaCl 5,85 g, eau q.s.p. 1 000 ml (375 ml A + 625 ml B).

- Tampon phosphate monopotassique H_2PO_4, pH 7,7 0,15 M.

2° Solutions d'ultracentrifugation :

- Bromure de potassium cristallisé (PROLABO)
- Saccharose (MERCK)
- Oléate de sodium (B.D.H.)
- Chlorure de sodium (PROLABO)

3° Solvants :

- Ether éthylique (MERCK)
- Méthanol (MERCK)
- Chloroforme (MERCK)
- Hexane (MERCK)

...

4° Supports de chromatographie et d'électrophorèse :

- Séphadex G 200, 150, 100, 75, 25, 10 (PHARMACIA)
- Sépharose 2 B (Pharmacia)
- D.E.A.E. cellulose (CALBIOCHEM)
- Silicagel H selon Stahl (MERCK)
- Amidon hydrolysé (CONNAUGHT)
- Agarose (INDUSTRIE BIOLOGIQUE)
- Cellogels (SEBIA)

5° Réactifs d'agglutination :

- Hématies de lapin fraiches ou conservées (Laboratoires MERIEUX)
- Chlorure de chrome pur en solution de densité 1,26 à 20 % de chrome (PROLABO)
- Huile d'olive.

6° Immunsérums :

- Préparations commerciales des Laboratoires HYLAND, BEHRINGWERKE, du Centre de Transfusion Sanguine et de Génétique Humaine de Rouen.
- Immunsérums de lapins, préparés dans notre laboratoire : immunsérums anti-β-lipoprotéines, anti-anticorps GER... et anti-anticorps SOR...

7° Phospholipides :

- Lysolécithine (egg lecithin grade II SIGMA)
- DL-α-lécithine (SIGMA)
- Sphingomyéline (bovine brain SIGMA)
- DL-α-phosphatidyl-éthanolamine (SIGMA)
- Phosphatidyl-inositol (KOCH and LIGHT)

...

8° Enzymes :

- Mercuripapaïne cristallisée (SIGMA)
- Pronase (B grade CALBIOCHEM)
- Trypsine (Salt free, cristallisée, A grade, CALBIOCHEM)
- Pepsine cristallisée (CALBIOCHEM).

9° Réactifs divers :

- Urée cristallisée (B.L.B.)
- Mercapto-éthanol (CALBIOCHEM)
- Cystéine monohydrate (KOCH and LIGHT)
- Iodo-acétamide (SIGMA)
- Albumine (Fraction V de Cohn, SIGMA)
- Héparine (ROCHE)
- Chlorure de sodium (PROLABO)
- Chlorure de magnésium (PROLABO)
- Sulfate d'ammonium (PROLABO)

III. - APPAREILS

- Centrifugeuse réfrigérée M.S.E. "Highspeed 18"
- Ultracentrifugeuse M.S.E. "Superspeed 50" avec rotor à angles n°2410
- Colonnes à chromatographie PHARMACIA
- Appareillage nécessaire pour la concentration des protéines par dépression dans des membranes en collodion.
- Appareillage pour filtration sur Millipores et filtres 0,22 µ type 6S
- pH-mètre
- Collecteur automatique de fractions APPELAB
- Enregistreur Uvicord L.K.B.
- Etaleur automatique pour couches minces SEBIA
- Appareil à ultra-sons M.S.E. 100 Watts sonde n° 34041.

...

CHAPITRE III : METHODOLOGIE

A. - METHODES GENERALES D'ETUDE DES PROTEINES

I. L'ULTRACENTRIFUGATION PREPARATIVE :

Nous avons utilisé une ultracentrifugeuse M.S.E. Superspeed 50 avec le rotor à angles n° 2410, pouvant recevoir 10 tubes en polypropylène de 1,5 cm de diamètre et d'une capacité de 10 ml.

1° Séparation des immunoglobulines de myélome :

Dans les cas de myélomes antilipoprotéines étudiés, l'immunoglobuline myélomateuse formant des complexes avec les lipoprotéines, nous avons employé pour dissocier ces complexes l'un des deux procédés suivants :

a) Dans nos premières recherches d'isolement et du purification des IgA GER... et SOR..., nous avons fait une ultracentrifugation à une densité de 1,25 dans un milieu de pH 3,5 contenant de l'urée 2 M, dans un champ de 105 000 g à + 4° C pendant 20 heures (77).

b) Dans nos recherches ultérieures, nous avons utilisé un procédé qui s'est avéré meilleur : une ultracentrifugation à une densité de 1,25 dans un milieu de pH 9,5 contenant de l'oléate de soude à 0,25 % dans un champ de 105 000 g à 4° C pendant 5 heures (78).

2° Isolement et purification des lipoprotéines sériques :

a) La totalité des lipoprotéines du sérum a été séparée par flottaison dans un milieu de densité 1,21 dans un champ de 105 000 g à 4° C pendant 40 heures.

...

b) Les différentes classes de β-lipoprotéines, après isolement et purification des β-lipoprotéines totales par un procédé décrit au chapitre V, ont été isolées selon la technique de Havel (79).

II. - CHROMATOGRAPHIE sur DEAE-CELLULOSE :

La résine que nous avons utilisée est de la DEAE-cellulose d'une capacité de 0,92 méq/g. Nous l'avons préparée selon le procédé décrit par SOBER et PETERSON (80), puis conditionnée avec le premier tampon utilisé pour la chromatographie. Nous avons employé des colonnes d'un diamètre compris entre 1,5 et 2,5 cm, avec une hauteur de DEAE variant selon la quantité de protéines à chromatographier, sachant que 1 mg de DEAE peut retenir 50 mg de protéines.

Les protéines éluées ont été détectées à la longueur d'onde de 280 mμ par passage dans un photomètre L.K.B. (type Uvicord II) relié à un enregistreur, puis collectées en fractions de 2,5 ml.

Nous avons utilisé cette technique :

1° Pour la purification des IgA anticorps GER... et SOR...

2° Pour la purification des α et β-lipoprotéines

3° Pour la purification du fragment Fab provenant de la digestion papaïnique des IgA GER... et SOR...

III. - FILTRATION sur GEL de SEPHADEX :

La filtration sur gel de Séphadex a été souvent nécessaire. Nous avons utilisé des gels de Séphadex variés, selon l'opération à accomplir. Ces gels ont été mis à gonfler pendant une durée variable selon la catégorie de Séphadex, dans le soluté servant à l'élution des colonnes, additionné d'azoture

...

de sodium à 1 p. 1000, afin d'éviter toute prolifération bactérienne. (A cette concentration, l'azoture de sodium n'intervient pas dans les réactions entre immunoglobulines et lipoprotéines.)

Nous avons utilisé des colonnes de type 45 x 2,5 ou 30 x 1,5 (Pharmacia) selon le cas. Parfois les colonnes ont été couplées. Nous avons toujours fait une élution verticale descendante. Les colonnes étaient munies d'adaptateurs permettant de déposer l'échantillon très régulièrement à la surface du gel.

Les fractions ont été collectées de la même façon que dans le cas des fractions provenant des chromatographies sur DEAE, le volume de ces fractions étant de 1 ou 2 ml selon les cas.

La filtration sur gel de Séphadex a été utilisée :

1° Pour purifier les α et β-lipoprotéines : Séphadex G 200 ;

2° Pour purifier le fragment Fab obtenu après digestion enzymatique des immunoglobulines myélomateuses GER... et SOR... : Séphadex G 100 ;

3° Pour déterminer approximativement les poids moléculaires des protéines selon ANDREWS (81) : Séphadex G 100 et G 200 ;

4° Pour étudier les interactions moléculaires entre les immunoglobulines purifiées et les lipoprotéines : Séphadex G 200, G 150 ou G 100.

5° Pour le dessalage des protéines avant concentration ou lyophilisation : Séphadex G 10 ou G 25.

IV. - PREPARATION et PURIFICATION des β-LIPOPROTEINES SERIQUES

La technique sera décrite au chapitre V (82).

V. - PREPARATION et PURIFICATION des α-LIPOPROTEINES SERIQUES

La technique sera décrite au chapitre V (83).

...

VI. - PREPARATION du FRAGMENT Fab :

La technique sera décrite au chapitre VIII.

VII. - METHODES IMMUNOLOGIQUES :

Elles nous ont permis de déterminer la pureté des immunoglobulines et des lipoprotéines à chaque étape de leur préparation ainsi que leurs caractères de migration et leur activité.

1° Electrophorèse en gel d'agarose selon NOBLE (84) ;

2° Electrophorèse sur acétate de cellulose ;

3° Electrophorèse sur gel d'amidon selon SMITHIES (85) ;

4° Immuno-électrophorèse : nous avons utilisé la technique de NGUYEN TRONG et ARDRY (86), dérivée de la méthode de GRABAR et WILLIAMS (87).

5° Technique de double diffusion en gel d'agarose selon OUCHTERLONY (88)(Fig. 6

6° L'hémagglutination passive : cette technique nous a permis de détecter l'activité des immunoglobulines et des antigènes ou haptènes étudiés.

Nous avons utilisé deux méthodes :

a) La première est celle de HALPERN et coll. (89) : des hématies de lapin, préalablement lavées, ont été benzidinées pour permettre la fixation d'antigènes (α et β-lipoprotéines dans nos expériences). Après incubation, les hématies ont été lavées afin d'éliminer l'excès de benzidine, puis remises en suspension. Pour titrer les sérums et les extraits étudiés, nous avons fait des séries de dilutions avec une solution de dextran 500 à 1 p. 10 000, dans les alvéoles d'une plaque à hémagglutination en matière plastique. A chaque dilution, nous avons ajouté une goutte de suspension d'hématies. Les résultats étaient lisibles trois heures après et cotés en : -, +, ++, +++, selon l'aspect obtenu. Pour chaque série de mesures, nous avions toujours des témoins faits avec des hématies sensibilisées sans anticorps.

...

Fig. 6 : Double diffusion en gel d'agarose :
Technique d'Ouchterlony.

Coloration des protéines à l'amido-Schwartz.

b) La seconde méthode utilisée est l'hémagglutination passive au chlorure de chrome (90), dérivée de la méthode de GOLD et FUDENBERG (91), (Tableau IV). Ici les hématies ont été sensibilisées par l'intermédiaire de chlorure de chrome. Le diluant était simplement un tampon phosphate.

Nous avons employé directement ces deux méthodes (Fig. 7), mais pour l'étude des structures antigéniques, nous avons utilisé la technique d'inhibition de l'hémagglutination passive (Fig. 8) : à une quantité constante d'anticorps donnant une réaction +++ en test direct, nous avons ajouté des quantités décroissantes de la substance testée comme antigène, puis après incubation, nous avons ajouté une goutte d'hématies sensibilisées. Dans ce cas, nous avons toujours fait un témoin avec des hématies sensibilisées, sans anticorps, et un témoin avec des hématies sensibilisées et l'anticorps à la dilution utilisée dans le test.

7° L'agglutination d'émulsions lipidiques activées : AELA (92) :

Cette technique nous a aussi servi de système de référence pour tester l'activité des immunoglobulines et pour déceler l'existence ou non du pouvoir inhibiteur des substances étudiées comme haptènes (Tableau V).

L'AELA est l'agglutination visible à l'oeil et au microscope des particules d'une émulsion lipidique, en présence d'un sérum ou d'une fraction de sérum contenant un anticorps réagissant avec une substance située à la surface de l'émulsion (Fig. 9). Les émulsions lipidiques peuvent être activées avec de nombreuses substances. Dans le présent travail, nous n'avons utilisé que des émulsions lipidiques activées à la β-lipoprotéine. Un mélange d'huile et de solution de β-lipoprotéines est soumis aux ultra-sons, l'émulsion

...

TABLEAU IV

L'HEMAGGLUTINATION PASSIVE au CHLORURE DE CHROME

1 volume de solution de beta-lipoprotéines à 1 500 µg/ml
dans du sérum physiologique à 4° C
+ 4 volumes de sérum physiologique à 4° C
+ 3 volumes d'une solution de chlorure de chrome à 4° C
(préparation à partir d'une solution-mère à 20 %
diluée 40 mn avant emploi et conservée à 4° C)
+ 1 volume d'hématies de lapin
lavées 3 fois avec du sérum physiologique

↓

10 mn à 4° C

↓

3 lavages dans 30 ml de sérum physiologique à 4° C
séparés par une centrifugation de 2 mn à 3 000 t/mn

↓

Surnageant

Culot d'hématies
enduites de beta-lipoprotéines

↓

Dilution dans
8 volumes de sérum physiologique

↓

Suspension d'hématies
enduites de beta-lipoprotéines

Fig. 7 : La technique d'hémagglutination passive : exemple de test direct.
(La lecture du test se fait de haut en bas.)

Fig. 8 : La technique d'hémagglutination passive : exemple d'inhibition du test direct.

TABLEAU V

L'AGGLUTINATION d'EMULSIONS LIPIDIQUES

ACTIVEES avec des BETA-LIPOPROTEINES

1 ml de solution de beta-lipoprotéines à 3 000 µg/ml
+ 0,075 ml d'huile d'olive

↓

Sonication 2 mn à 0° C

↓

Chylomicrons synthétiques

↓

Dilution des chylomicrons au 1/2
dans du sérum physiologique tamponné pH 7

↓

10 mn au bain-marie à 37° C

↓

3 lavages avec 0,5 ml d'eau distillée
déposée en double couche
avec une centrifugation de 1 mn à 5 000 t/mn
entre chaque lavage

↓

Pellicule

Phase inférieure

↓

Gel-filtration sur Séphadex G 200
en sérum physiologique tamponné à pH 7

↓

Emulsion lipidique activée

Fig. 9 : Le test d'AELA : émulsion lipidique activée à la beta-lipoprotéine humaine additionnée de tampon phosphate (tube de gauche) et de sérum de lapin anti-beta-lipoprotéine humaine dilué de 1/10 à 1/100 000 (autres tubes de gauche à droite).

Fig. 10 : Le test d'AELA : inhibition par la beta-lipoprotéine humaine de l'agglutination d'une émulsion lipidique activée à la beta-lipoprotéine, par un sérum de lapin anti-beta-lipoprotéine dilué au 1/1000. De gauche à droite, les tubes contiennent respectivement 6 µg, 0,6 µg, 0,06 µg et 0,006 µg de beta-lipoprotéine. Le tube de droite ne contient ni sérum de lapin anti-beta-lipoprotéine, ni beta-lipoprotéine en excès.

lipidique obtenue est d'abord lavée à l'eau pour éliminer les éléments mal dispersés aux ultra-sons, puis filtrée sur du Sépharose 2 B. Pour faire le test proprement dit d'AELA, l'émulsion est diluée avec du tampon phosphate, puis sur une plaque de verre, on mélange la fraction à étudier en dilutions sériées avec un même volume de l'émulsion diluée. La lecture se fait deux heures après et les résultats sont cotés en fonction de la taille des agglutinats formés et des particules restées mobiles. Comme pour les techniques d'hémagglutination passive, on a souvent utilisé l'inhibition de l'AELA au cours des expériences (Fig. 10).

VIII. - DOSAGE des PROTEINES :

Elles ont été dosées selon la technique de Lowry (93).

B. - METHODES GENERALES D'ETUDE DES LIPIDES

I. - METHODES d'EXTRACTION des LIPIDES :

1° Extraction par l'éther ou l'éther-méthanol à 0° C

La technique sera décrite au chapitre VII

2° Extraction par l'alcool-éther à - 20° C

La technique sera décrite au chapitre VII (94).

II. - TECHNIQUE de CHROMATOGRAPHIE sur COUCHE MINCE (Fig. 11)

Des plaques de verre de 20 x 20 cm ont été enduites de gel de silice et activées deux heures à 100° C. Les fractions étudiées ont été évaporées à sec, reprises dans du chloroforme puis déposées en spots ou en bandes selon

...

Fig. 11 : Séparation par chromatographie sur couche mince de gel de silice, des différents lipides extraits d'une solution de beta-lipoprotéine par la méthode de Folch. Révélation par le réactif phosphomolybdique.

1. Esters du cholestérol
2. Triglycérides
3. Acides gras
4. Diglycérides
5. Cholestérol libre
6. Monoglycérides
7. Phospholipides

le cas, sur la plaque de Silicagel et chromatographiées avec un système de solvants adapté à chaque expérience et dont la composition sera donnée aux chapitres correspondants.

Après chromatographie, les différentes substances ont été révélées, soit par réaction colorée, soit dans le cas où nous voulions récupérer ces substances, par des vapeurs d'iode. La récupération des fractions à partir de la couche de silice a été faite par un mélange chloroforme/méthanol/eau : 50/50/15.

III. - DOSAGE du PHOSPHORE :

Nous avons utilisé la technique de FISKE et SUBBAROW (95)

IV. - DOSAGE du CHOLESTEROL :

Nous avons utilisé un dosage automatique selon FERRO et HAM (96).

V. - DOSAGE des TRIGLYCERIDES :

Nous avons utilisé un dosage automatique selon KESSLER et LEDERER.

CHAPITRE IV :

DECOUVERTE, ISOLEMENT ET PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES MYELOMATEUSES

Dans le cas de Monsieur GER..., comme dans celui de Monsieur SOR..., l'existence chez le malade de complexes circulants entre la paraprotéine et les lipoprotéines circulantes nous a amené en tout premier lieu à isoler et à purifier cette paraprotéine, afin d'étudier le site lipoprotéique avec lequel elle réagit.

I. - PROPRIETES du SERUM ENTIER :

1° Existence de complexes dans le sérum

Dans les deux cas, il a été très facile de mettre en évidence l'existence d'associations moléculaires entre la paraprotéine et les lipoprotéines circulantes. Nous avons observé un aspect anormal des arcs α_1 et β -lipoprotéines en immuno-électrophorèse, lorsque l'on met en présence le sérum entier et un immunsérum spécifique. Ces arcs sont allongés vers le point de dépôt du sérum et entourent ce point (Fig. 12).

Dans le cas GER..., les β -lipoprotéines pénètrent mal dans le gel d'agarose et migrent moins loin que normalement ; en gel d'amidon, alpha et beta-lipoprotéines ne pénètrent pas et forment un précipité au point de dépôt du sérum avec une grande partie de l'IgA myélomateuse (Fig. 4).

Dans le cas SOR..., les lipoprotéines ne pénètrent pas dans le gel et forment des trainées, une partie restant au point de dépôt (Fig. 4). En filtration sur gel de Séphadex G 200, l'IgA myélomateuse est en grande partie exclue.

...

Fig. 12 : Immuno-électrophorèse en gel d'agarose

1 : Sérum témoin

2 : Sérum GER...

3 : Sérum SOR...

a : Sérum anti-humain normal

b : Sérum anti-beta-lipoprotéine humaine

c : Sérum anti-alpha-lipoprotéine humaine

Fig. 13 : Précipitation du sérum GER... par dilution en solution saline.

Au gauche : Sérum non dilué

Au centre : Sérum dilué au 1/6 en solution saline physiologique

A droite : Sérum normal.

L'ultracentrifugation dans un milieu de densité 1,063 permet de séparer par flottaison une grande partie des IgA myélomateuses avec les β -lipoprotéines. Dans un milieu de densité 1,21, on peut séparer une partie plus importante encore.

La solubilité de ces associations moléculaires est relativement faible: une saturation à 25 % en sulfate d'ammonium suffit à précipiter l'IgA myélomateuse, les α et les β -lipoprotéines du sérum. Dans le cas GER..., ces complexes sont encore plus instables ; il suffit de diluer le sérum dans une solution saline physiologique, pour voir apparaitre un précipité (Fig. 13). Ce précipité est maximum pour une dilution au 1/5e et contient une grande partie de l'IgA myélomateuse et des α et β -lipoprotéines du sérum.

2° L'activité spécifique anti-lipoprotéines :

Elle est assez peu importante, mais existe cependant dans le sérum entier, l'anticorps étant en partie inhibé par l'antigène. On n'observe pas de lignes de précipitation en agarose avec les lipoprotéines pures. On n'a pas non plus de réactions d'hémagglutination passive avec ces mêmes lipoprotéines (une très légère réaction positive dans le cas GER... avec des hématies enduites de β -lipoprotéines.)

Cependant dans le cas GER..., si on débarrasse le sérum des complexes IgA myélomateuse - lipoprotéines par ultracentrifugation, on obtient avec des lipoprotéines pures une faible précipitation en agarose et des réactions d'hémagglutination passive très positives et atteignant un titre très fort. Dans le cas SOR..., le sérum débarrassé des lipoprotéines ne donne pas de ligne de précipitation en agarose, mais donne des réactions positives d'hémagglutination passive avec les lipoprotéines. Les titres obtenus sont toutefois

...

moins élevés que dans le cas GER... (Tableau VI). Dans les deux cas, l'activité spécifique du sérum n'est pas fonction de la température. Elle est inhibée par de petites quantités de lipoprotéines, mais ni par l'albumine, ni par la γ-globuline, ni par le sérum humain débarrassé de ses lipoprotéines.

II. - PURIFICATION des IgA MYELOMATEUSES :

Nous avons utilisé d'abord, pour rompre les liens entre IgA myélomateuses et lipoprotéines, une technique faisant intervenir de l'urée et un pH acide (77), mais l'urée dénaturant les protéines, nous avons préféré utiliser par la suite la précipitation des complexes immuns, suivie d'une ultracentrifugation en milieu de densité 1,21 en présence d'oléate de sodium. Les γ globulines sont ensuite purifiées par chromatographie sur DEAE-cellulose (78) (Tableau VII). Les précipités formés de lipoprotéines sériques et de leurs anticorps sont facilement dissous par les détergents qui, en recouvrant la partie lipidique des lipoprotéines, permettent leur séparation de l'anticorps. De plus, les détergents forment avec l'antigène des micelles très légères que l'on peut séparer ultérieurement par ultracentrifugation (97, 98). La première étape a été la précipitation des complexes immuns circulants chez Monsieur GER.. et chez Monsieur SOR...

Dans le cas GER..., le précipité se forme spontanément par dilution du sérum au 1/5e avec une solution saline physiologique. Ce précipité est séparé du reste du sérum par centrifugation, puis lavé cinq fois en solution saline. Ce précipité contient l'IgA myélomateuse et les lipoprotéines du sérum porteuses du site Pg. Dans le cas SOR..., le précipité se forme par addition de sulfate d'ammonium à 25 % de saturation au sérum dilué au 1/4 avec une solution saline physiologique. Ce précipité est séparé du reste du sérum par

...

TABLEAU VI

HEMAGGLUTINATION PASSIVE (HAP)

(Titre en HAP +++)

avec la BETA-Lp comme antigène FIXEE sur les HEMATIES

	IgA GER...	IgA SOR...
Sérum entier	625	0
Anticorps purifié à partir des lipoprotéines	200 000	3 000
Quantité d'anticorps qui donne encore une HAP +++ (en µg)	- Polymères : 0,001	-
	- Monomère : 0,06	# 0,1

TABLEAU VII

SCHEMA de la PURIFICATION des IgA anti-Pg

par la METHODE à l'OLEATE de SODIUM

Sérum GER...

Dilution au 1/5e
en sérum physiologique

Sérum SOR...

Dilution au 1/4e
en sérum physiologique
+ $(NH^4)_2SO_4$ à 25 % de saturation

Précipités auto-immuns

3 lavages en sérum physiologique

Dissolution du précipité dans une solution de d = 1,21
à 0,25 % d'oléate de sodium à 45° C

Ultracentrifugation 4 h à 10° C et 105 000 g

Pellicule :
beta-Lp + oléate

Phase supérieure (2/5e)
anticorps + traces d'oléate

Phase inférieure (3/5e) :
anticorps presque pur

Dialyse contre du
tampon PO_4 0,01 M pH 6,5

Chromatographie sur DEAE

Tampon PO_4 0,01 M pH 6,5

Tampon PO_4 0,02 M pH 6,5

Tampon PO_4 0,05 M pH 6,5

Monomère GER...

Tampon PO_4 0, 1 M pH 6,5

Polymère GER...
Monomère SOR...

Tampon PO_4 0,2 M pH 6,5

Tampon PO_4 0,5 M pH 6,5

par centrifugation. Dans les deux cas, le précipité a été dissous directement dans une solution de densité 1,21 contenant du bromure de potassium, du saccharose et de l'oléate de sodium à 0,25 %, portée préalablement à 45° C. On obtient une solution complète en dissolvant 1 mg de précipité dans 2 ml de solution de densité 1,21. La solution obtenue est déposée dans des tubes à ultracentrifugation, puis on fait une ultracentrifugation de 4 heures à 10° C, dans un champ moyen de 105 000 g. A la surface des tubes, on recueille une pellicule composée des lipoprotéines et de l'oléate ; la phase supérieure du tube (2/5e du volume) contient de l'anticorps et des traces d'oléate ; la phase inférieure (3/5e) contient l'anticorps presque pur et est purifiée par chromatographie sur DEAE-cellulose.

Après 16 heures de dialyse à 4° C dans un tampon phosphate 0,01 M pH 6,5, la fraction est déposée sur la colonne de DEAE conditionnée avec le tampon phosphate précédent. Puis on fait passer sur la colonne successivement des tampons de molarité croissante : 0,01 M ; 0,02 M ; 0,05 M ; 0,1 M ; 0,2 M ; 0,5 M. On recueille des fractions de 2,5 ml par l'intermédiaire d'un collecteur. Dans le cas GER..., une partie de l'IgA sous forme monomère est éluée avec le tampon 0,05 M ; le reste, sous forme polymérisée, peut présenter un dédoublement du pic avec le tampon 0,1 M, dont la seconde partie est de l'IgA contaminée par de l'albumine. Dans le cas SOR..., l'IgA est éluée sous forme monomère avec le tampon 0,1 M, la partie descendante du pic contenant souvent de l'IgA contaminée par de l'albumine.

Les fractions obtenues, après dialyse contre de l'eau distillée pour éliminer les sels, sont conservées sous forme congelée ou lyophilisée. Les immunoglobulines ainsi obtenues sont très pures et débarrassées de toute trace de lipoprotéines.

...

III. - PROPRIETES des IgA PURIFIEES

1° Nature :

L'étude de la nature des IgA purifiées a été faite grâce à la filtration sur Séphadex G 200 et aux différentes techniques d'électrophorèse (Fig.14) Dans le cas GER..., comme dans le cas SOR..., la filtration sur Séphadex G 200 et l'électrophorèse en gel d'amidon ont montré que les préparations, même très pures, extraites des complexes circulants, n'étaient pas homogènes et contenaient plusieurs sortes de molécules : la première, exclue du gel de Séphadex G 200, a une faible mobilité anodique en gel d'amidon ; la seconde est légèrement retardée en gel de Séphadex et a une mobilité anodique plus importante en gel d'amidon ; enfin, la troisième est nettement retardée en gel de Séphadex et migre beaucoup plus anodiquement. Mais l'IgA SOR... et l'IgA GER... diffèrent par leur degré de polymérisation et la charge du monomère. Plus de 50 % de la molécule d'IgA GER... se trouve sous forme polymérisée, alors que la quantité de polymère présente dans le cas SOR... ne dépasse pas 5 %.

En gel d'amidon, le monomère GER... a une charge électrique inférieure à celle du monomère SOR... En cellogel, le monomère SOR... a une plus grande mobilité que le monomère GER... En immuno-électrophorèse, on constate que dans les deux cas, il s'agit bien d'IgA qui précipitent par les immunsérums spécifiques anti-IgA du commerce. Leur chaine légère est de la variété kappa. Une ultracentrifugation analytique faite avec le monomère GER... a donné un poids moléculaire de 180 000. En gel-filtration, on a trouvé des poids moléculaires équivalents pour le monomère GER..., le monomère SOR... et l'IgA provenant de sérums normaux.

...

Fig. 14 : Electrophorèse en gel d'amidon des sérums de myélomes anti-Lp Pg : cas GER... (4) et cas SOR... (2), ainsi que des globulines myélomateuses provenant de ces sérums (3, 1). Coloration à l'amido-Schwartz.

Dans les deux cas, la digestion par la papaïne permet d'obtenir deux fragments. Le plus abondant est élué en DEAE avec du tampon 0,05 M, l'autre moins abondant est élué avec un tampon 0,5 M. L'immuno-électrophorèse a montré que le premier fragment était le fragment Fab dont le poids moléculaire est d'environ 45 000 et que le second fragment était le fragment Fc.

2° Activité :

Dans les deux cas, aussi bien du point de vue physico-chimique que du point de vue immunologique, on a trouvé que l'IgA du myélome et celle extraite des complexes circulants étaient identiques. L'activité des IgA anticorps en présence de lipoprotéines pures a été mise en évidence, d'une part, par des réactions secondaires, d'autre part, par des réactions primaires.

a) Réactions secondaires :

Seule l'IgA GER... donne des réactions de précipitation en solution saline et en gel d'agarose avec des lipoprotéines purifiées. La courbe de précipitation en solution de sérum physiologique à pH 7,3 a été établie en ajoutant à des quantités constantes d'IgA GER... purifiée (ici 500 µg) des quantités de β-lipoprotéines pures variant de 5 à 800 µg. Après 16 heures d'incubation à 4° C, les précipités ont été séparés par centrifugation, lavés dans une solution de sérum physiologique, puis repris dans 0,5 ml de solution de soude 0,1 N. Les protéines ainsi obtenues ont été dosées par la réaction de Lowry.

Cette courbe de précipitation montre une augmentation très rapide du précipité obtenu, en fonction de la quantité de lipoprotéines ajoutées. Puis très vite, on atteint un plateau qui est suivi d'une diminution du précipité due à une inhibition de la précipitation lorsque les quantités d'antigène sont trop importantes (Fig. 15).

...

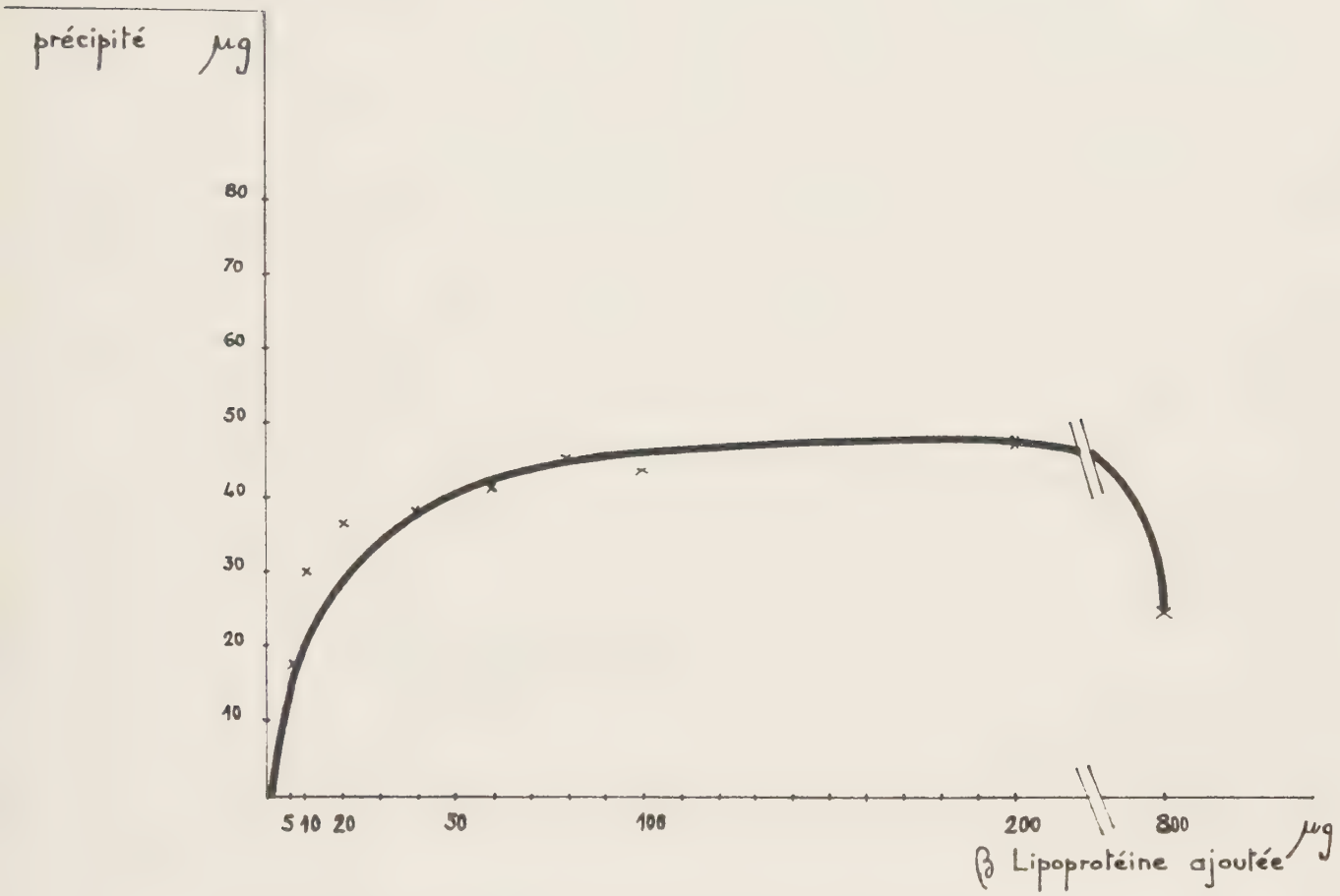


Fig. 15 : Précipitation en solution saline physiologique de beta-lipoprotéines humaines purifiées, par 500 µg d'IgA anti-Lp Pg purifiée, provenant du cas GER... L'inhibition de la précipitation commence pour des quantités de beta-lipoprotéine supérieures à 400 µg.

En présence d'hématies sensibilisées avec des lipoprotéines, les IgA GER... et SOR... donnent toutes deux des réactions d'hémagglutination positives +++,mais leur activité spécifique est très différente. Avec 10^{-4} µg d'IgA GER..., on a encore des réactions ++, alors que pour obtenir une même réaction, il faut 10^{-1}µg d'IgA SOR... En outre, dans le cas GER..., le polymère est beaucoup plus actif que le monomère, car il faut 5×10^{-2} µg pour avoir une réaction +++.

Les fragments obtenus après digestion par la papaïne sont dépourvus d'activité précipitante ou agglutinante. Le fragment Fab permet toutefois d'inhiber les réactions obtenues avec les molécules entières.

Toutes ces réactions d'hémagglutination passive peuvent être inhibées par des lipoprotéines, alors qu'aucune autre protéine ne donne d'inhibition.

b) Réactions primaires :

Les interactions moléculaires entre lipoprotéines et IgA myélomateuses purifiées ou fragments Fab seront étudiées au chapitre VIII.

CHAPITRE V :

LES LIPOPROTEINES REACTIVES

L'ANTIGENE Pg

Les immunoglobulines purifiées provenant des cas de myélomes GER... et SOR... réagissent avec un groupement spécifique, présent non seulement sur la β-lipoprotéine, mais aussi sur la α-lipoprotéine du sérum. Ceci nous a amené à mettre au point des techniques permettant d'obtenir des β-lipoprotéines et des α-lipoprotéines sériques très pures.

I. - PREPARATION et PURIFICATION des β-LIPOPROTEINES SERIQUES (Tableau VIII)

Nous avons utilisé ici une technique mise au point dans notre laboratoire par POULLIN et coll. (82) et dérivée de celle BURSTEIN (99) : les β-lipoprotéines d'un sérum isolé ou d'un mélange de sérums sont précipitées par un polyanion puis, après chromatographie sur DEAE-cellulose, purifiées par une filtration sur gel de Séphadex G 200.

1° Précipitation par un polyanion :

- 1 volume de sérum est dilué dans 1 volume de tampon véronal de pH 5,5, puis le pH de l'ensemble est ajusté à 5,5.

- Au sérum ainsi dilué, on ajoute une solution précipitante composée de 2 volumes d'héparine à 20 p. 1000 dans du tampon véronal de pH 5,5 et de 2 volumes de chlorure de magnésium à 50 p. 1000 dans du tampon véronal de pH 5,5.

- Rapidemnnt, on voit apparaitre un précipité que l'on centrifuge à 4° C ;

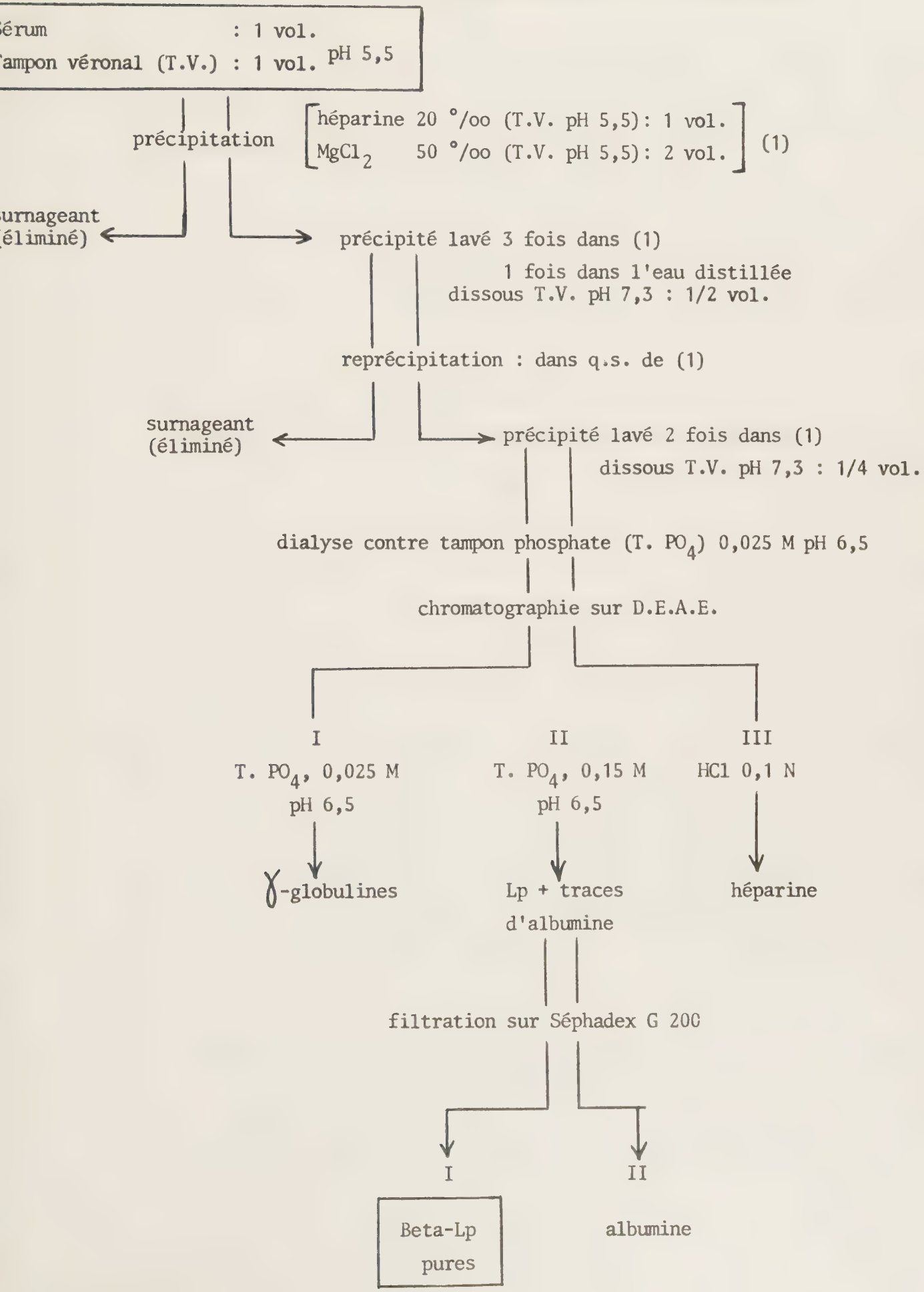
- Le précipité est lavé trois fois avec la solution précipitante, puis une fois avec de l'eau distillée.

- Il est ensuite dissous dans un tampon véronal pH 7,3.

...

TABLEAU VIII

PREPARATION DES BETA-LIPOPROTEINES SERIQUES



- La solution de β-lipoprotéines ainsi obtenues est reprécipitée avec la solution précipitante. Le précipité est lavé deux fois avec la solution précipitante, puis dissous dans du tampon véronal pH 7,3.

L'analyse immuno-électrophorétique de la solution de β-lipoprotéines obtenue montre des traces de γ G, de l'albumine. C'est pourquoi, les protéines ayant été dosées par la réaction de Lowry, on les chromatographie sur DEAE-cellulose.

2° Chromatographie sur DEAE-cellulose :

Après une dialyse de 24 heures dans un tampon phosphate 0,025 M de pH 6,5, la solution de β-lipoprotéines est déposée sur une colonne de DEAE préalablement conditionnée avec le tampon phosphate 0,025 M de pH 6,5, la quantité de DEAE étant fonction de la quantité de protéines à chromatographier. On fait passer sur la colonne successivement des tampons phosphate de pH 6,5 de molarité croissante : 0,025 M ; 0,15 M ; 0,5 M. On recueille des fractions de 2,5 ml avec un collecteur de fractions et leur absorption est lue à 280 mμ. La β-lipoprotéine est éluée avec le tampon 0,15 M (Fig. 16). Cette solution de β-lipoprotéines contient parfois des traces d'albumine, qui sont éliminées par une filtration sur gel de Séphadex G 200 (Fig. 17). A la sortie de cette filtration, on obtient des β-lipoprotéines très pures à l'analyse électrophorétique (Fig. 18), qualitativement normales, spécifiques du point de vue antigénique et représentant les différentes classes de β-lipoprotéines contenues dans un sérum.

II. - PREPARATION et PURIFICATION des α_1-LIPOPROTEINES SERIQUES (Tableau IX)

Comme pour la préparation des β-lipoprotéines, nous avons utilisé une méthode mise au point au laboratoire par BEAUMONT et LEMORT (83), qui

...

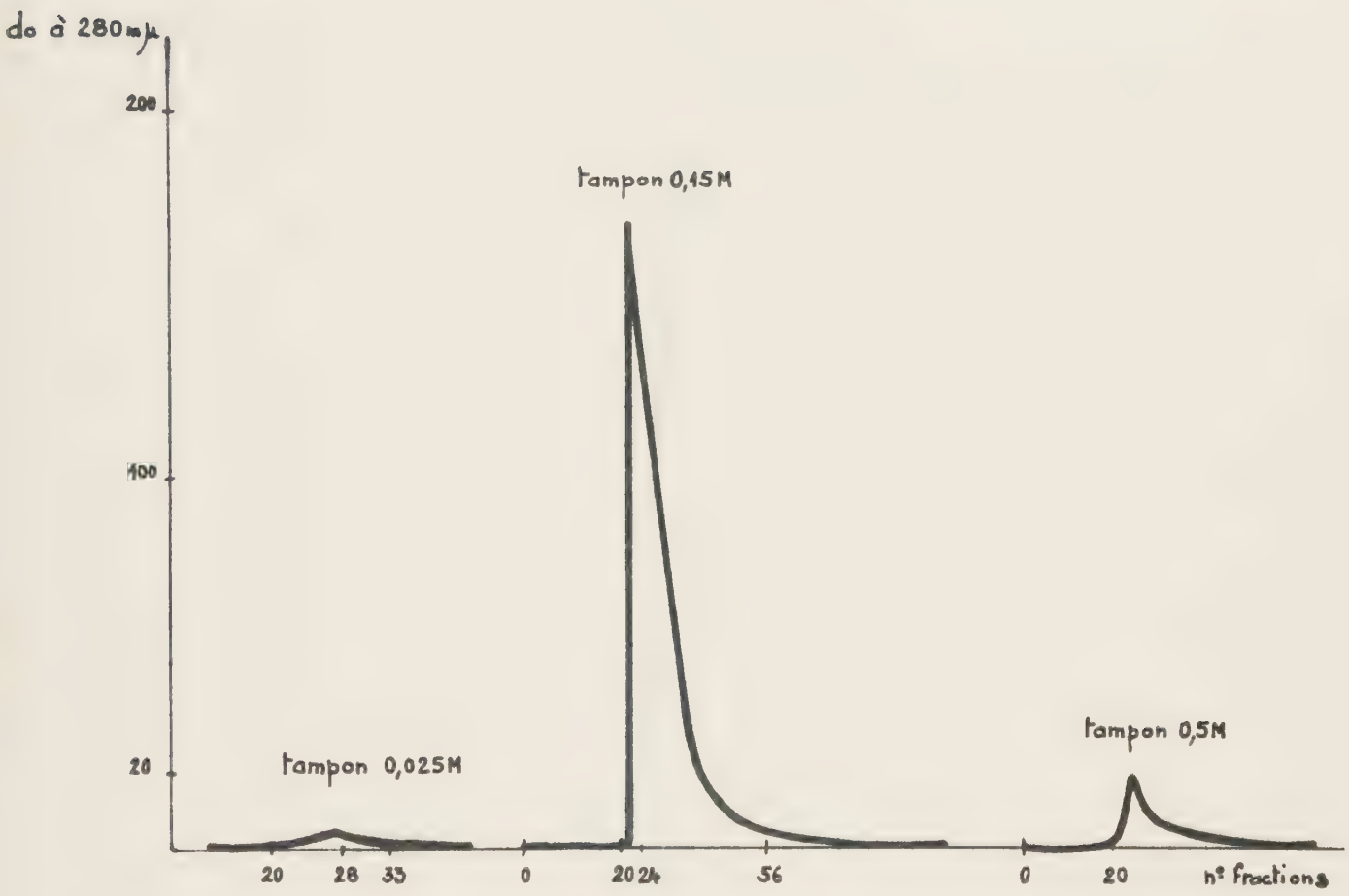


Fig. 16 : Chromatographie sur DEAE-cellulose de la solution de beta-lipoprotéines obtenue par précipitation de sérums humains par l'héparine et le chlorure de magnésium.

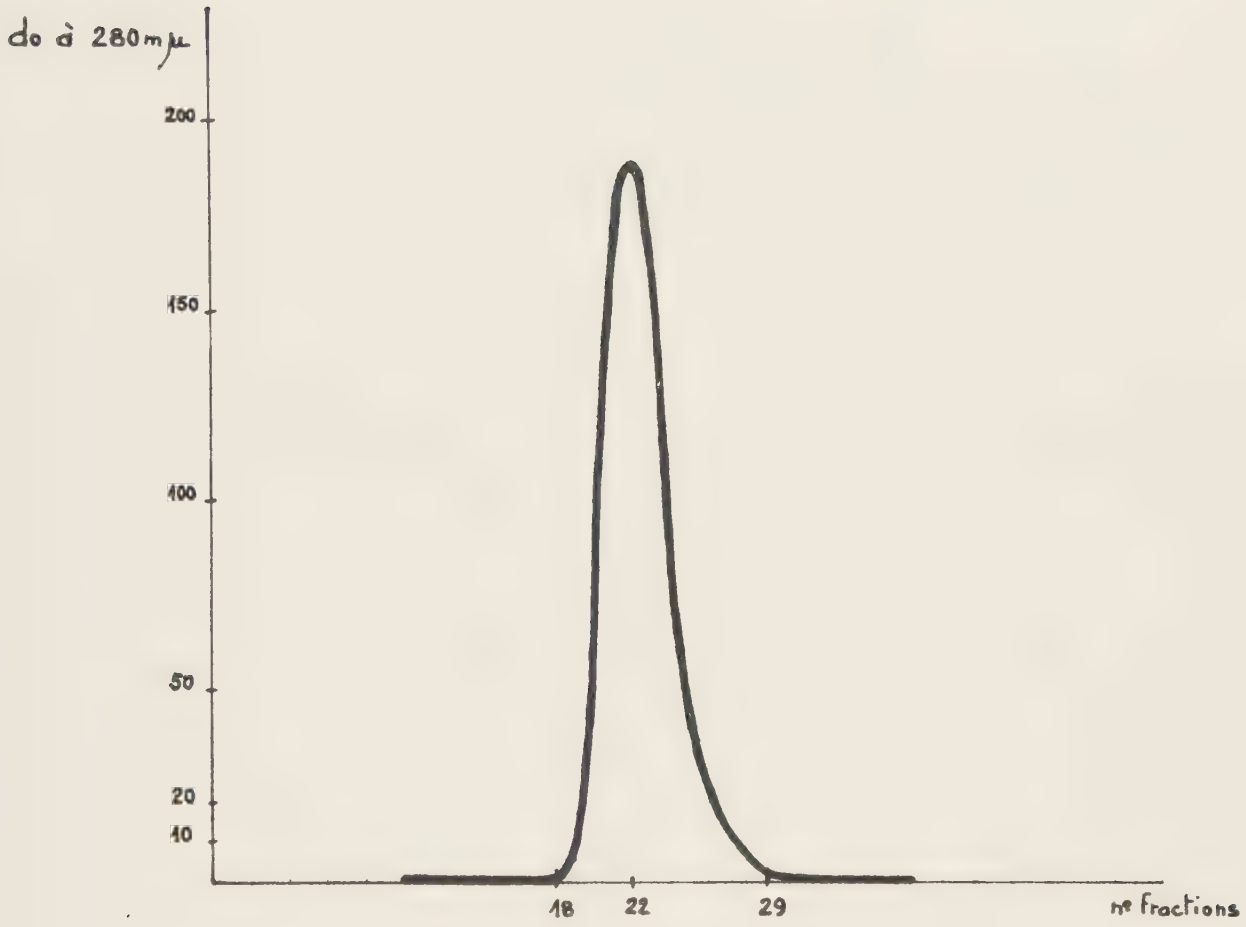


Fig. 17 : Filtration sur Séphadex G 200 de la fraction obtenue en DEAE avec le tampon 0,15 M pH 6,5 à partir de la solution de beta-lipoprotéines.

Fig. 18 : Immuno-électrophorèse sur agarose de la solution de beta-lipoprotéines obtenue après filtration sur Séphadex G 200. Coloration à l'amido-schwartz.

1. : Sérum normal
2. : Solution de beta-lipoprotéines
3. : Antisérum humain normal
4. : Sérum de lapin anti-beta-lipoprotéines.

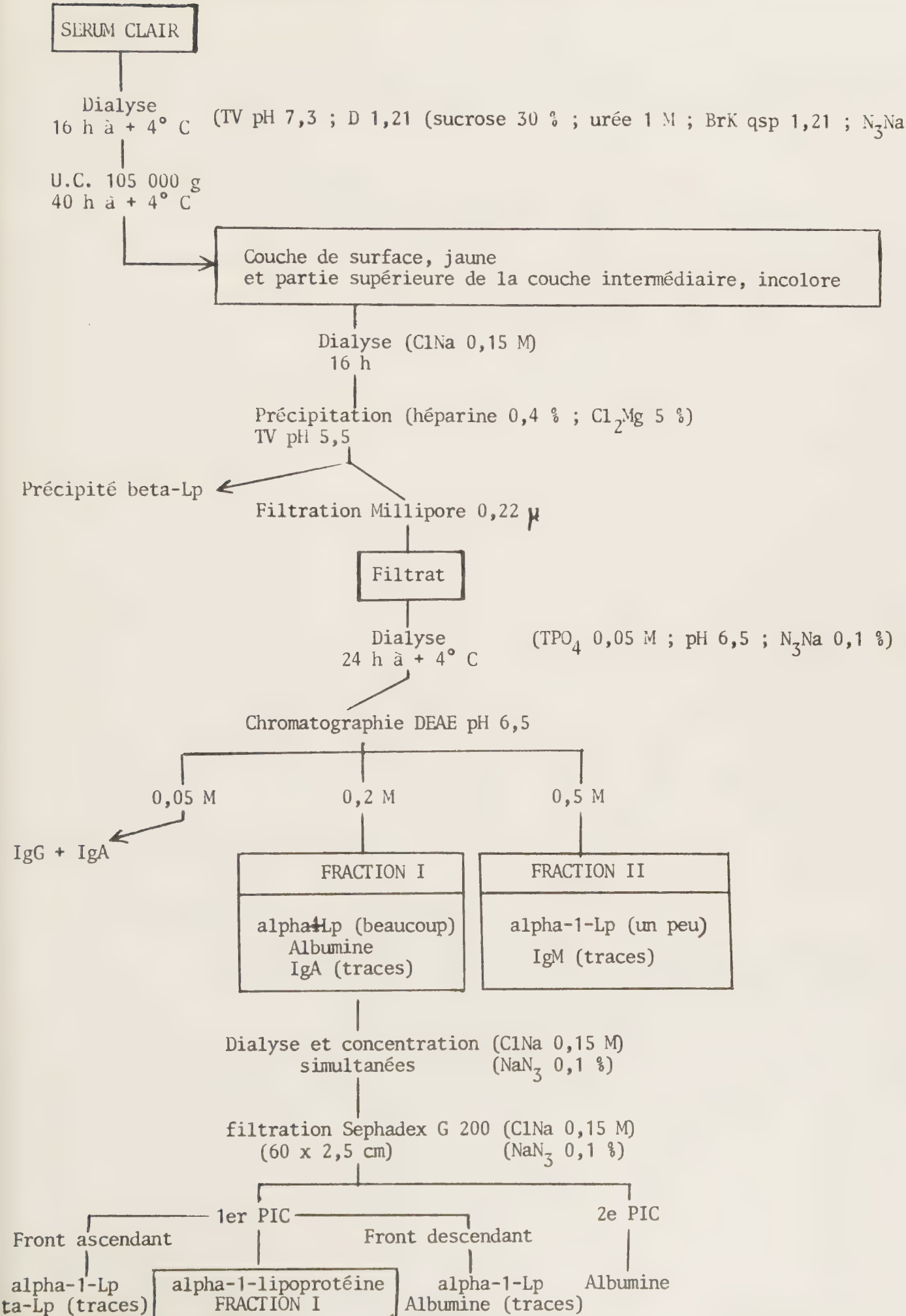
Fig. 19 : Double diffusion en agarose. Coloration à l'amido-schwartz.

A la périphérie : en 3, antisérum humain normal
en 4, sérum de lapin anti-beta-lipoprotéines

Au centre, en 2 : solution de beta-lipoprotéines obtenue après filtration sur Séphadex G 200.

TABLEAU IX

PREPARATION DES ALPHA-1-LIPOPROTEINES DU SERUM



combine l'ultracentrifugation, la précipitation par un polysaccharide, la chromatographie sur DEAE-cellulose et la filtration sur Séphadex G 200.

1° Ultracentrifugation :

Un sérum isolé ou un mélange de sérums est d'abord dialysé une nuit contre une solution de densité 1,21, puis soumis à une ultracentrifugation de 40 heures à 4° C dans un champ de 105 000 g. Après centrifugation, on recueille dans chaque tube d'ultracentriguation la couche supérieure jaune et 0,5 ml de la couche intermédiaire, claire. La fraction ainsi obtenue contient surtout des α et des β-lipoprotéines, mais aussi de l'albumine, des γ G et des γ A-globulines.

2° Séparation des β-lipoprotéines par précipitation :

Après une dialyse d'une nuit contre une solution de sérum physiologique, la fraction recueillie en ultracentrifugation est diluée au demi dans du tampon véronal de pH 5,5 puis précipitée par une quantité égale au volume total de la solution précipitante utilisée dans la technique précédente. On laisse précipiter 3 heures à 4° C, puis on centrifuge et on filtre sur millipore 0,22 μ le surnageant. Le filtrat obtenu contient les α-lipoprotéines, de l'albumine, des γ A, des γ G et des γ M-globulines et de légères traces de β-lipoprotéines.

3° Chromatographie sur DEAE-cellulose :

Le filtrat obtenu après filtration sur Millipore est dialysé une nuit à 4° C contre du tampon phosphate 0,05 M de pH 6,5, puis déposé sur une colonne de DEAE cellulose conditionnée préalablement avec le même tampon phosphate. On passe ensuite successivement sur la colonne, des tampons phosphate de pH 6,5

...

de molarité 0,05 M ; 0,2 M ; 0,5 M. Les α_1-lipoprotéines contaminées par des traces de β-lipoprotéines, de γ A-globulines et d'albumine, sont éluées avec le tampon 0,2 M (Fig. 20).

4° Filtration sur Séphadex G 200 :

Les dernières impuretés sont éliminées après concentration de la fraction obtenue en DEAE avec le tampon phosphate 0,2 M par une filtration sur double colonne de Séphadex G 200. Cette double colonne est obtenue en montant en série deux colonnes de 40 x 2,5 cm de Séphadex G 200. On sépare ainsi deux fractions, la première contenant, après élimination du début et de la fin du pic, l'α_1-lipoprotéine pure (Fig. 21).

L'α_1-lipoprotéine ainsi préparée est très pure, qualitativement normale et conserve toutes ces caractéristiques immunologiques (Fig. 22).

III. - MISE en EVIDENCE d'une SPECIFICITE COMMUNE aux α et β-LIPOPROTEINES SERIQUES PROVENANT d'un MELANGE de SERUMS :

Les premières expériences ont été faites avec l'IgA myélomateuse purifiée provenant du cas GER... et nous ont montré que le groupement spécifique correspondant à cet anticorps était présent à la fois sur les α-lipoprotéines et sur les β-lipoprotéines sériques. Par la suite, nous avons montré que l'IgA myélomateuse SOR... réagissait de la même manière avec les α et β-lipoprotéines sériques.

1° L'IgA myélomateuse GER... a les caractères d'un anticorps anti-β-lipoprotéine :

Ces caractères ont été mis en évidence grâce à la technique de double diffusion en gel d'agarose selon Ouchterlony et à l'immuno-électrophorèse.

...

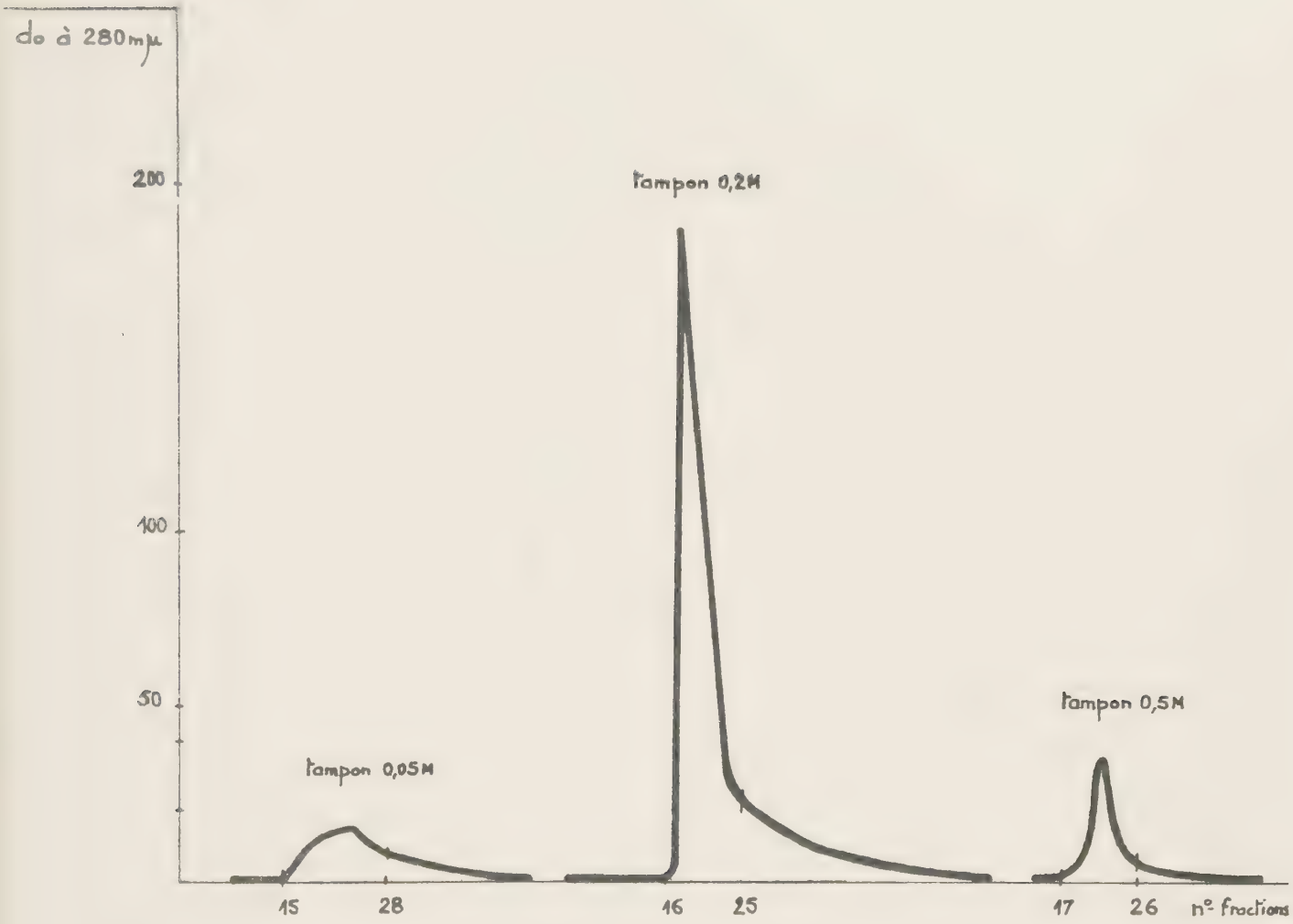


Fig. 20 : Chromatographie sur DEAE-cellulose du surnageant obtenu après précipitation des beta-lipoprotéines.

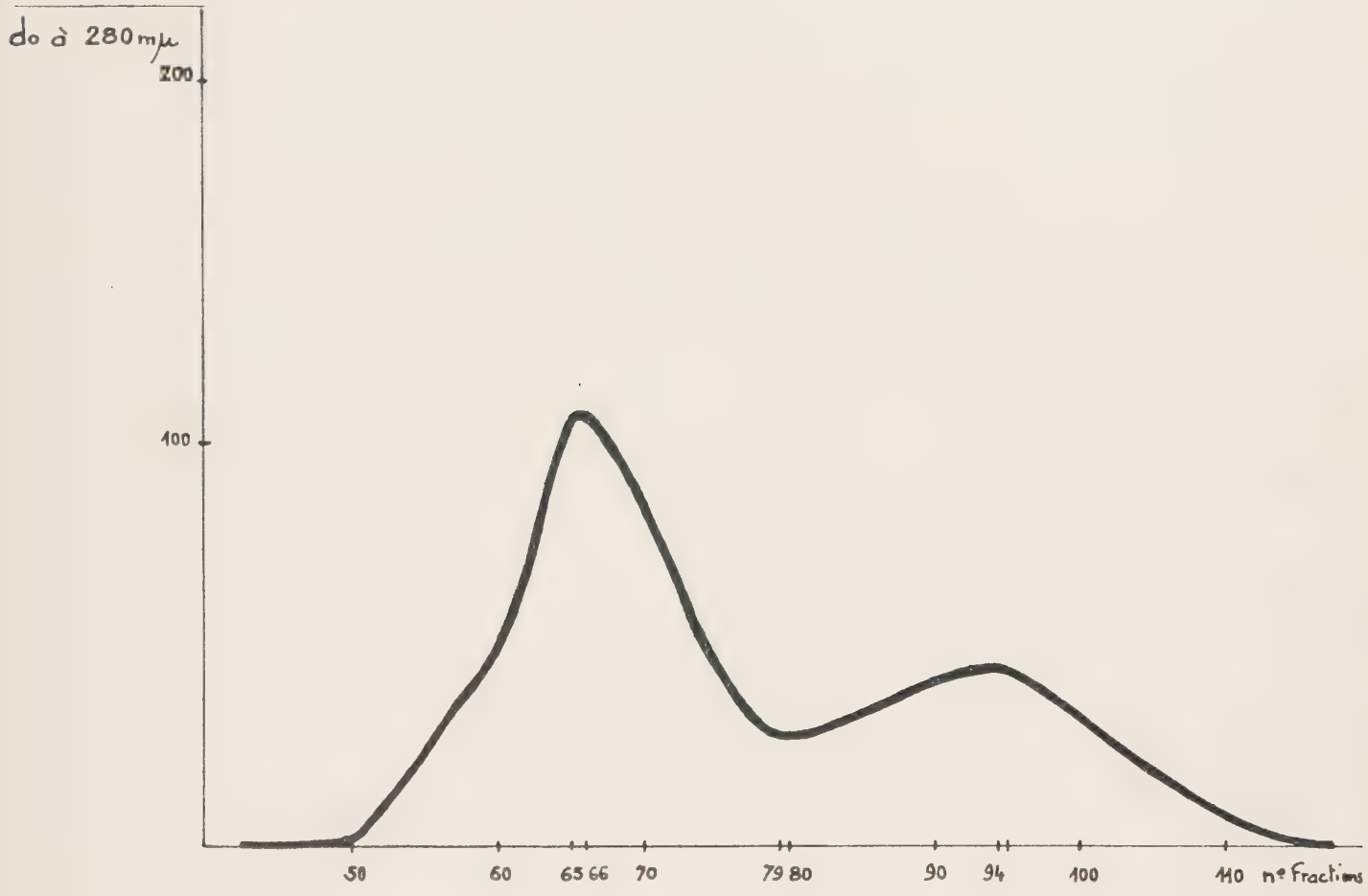


Fig. 21 : Filtration sur Séphadex G 200 de la fraction obtenue sur DEAE-cellulose avec le tampon 0,2 M pH 6,5.

Fig. 22 : Immuno-électrophorèse d'une préparation d'alpha-1-lipoprotéine et de beta-lipoprotéine purifiées. Coloration à l'amido-Schwartz.

1. Sérum humain normal
2. Alpha-1-lipoprotéine
3. Beta-lipoprotéine
a. Antisérum humain normal
b. Sérum anti-alpha-1-lipoprotéine
c. Sérum anti-beta-lipoprotéine.

Si l'on met en présence le sérum GER... débarrassé par ultracentrifugation de ses α et β-lipoprotéines, on constate qu'il précipite ses propres β-lipoprotéines et qu'il précipite aussi les β-lipoprotéines provenant de sujets normaux ou xanthomateux, alors que les autres sérums humains ne précipitent pas les β-lipoprotéines humaines.

En immuno-électrophorèse, le sérum GER... mis en présence du sérum humain total provenant de Monsieur GER..., de sujets normaux ou xanthomateux, produit un seul arc de précipitation qui se colore fortement au noir Soudan et correspond à la β-lipoprotéine.

2° <u>La spécificité existant sur les β-lipoprotéines existe aussi sur les α-lipoprotéines</u> :

La spécificité anti-α-lipoprotéine n'a pu être mise en évidence que plus tard, car les conditions de précipitation en milieu gélifié ne sont pas les mêmes que dans le cas de la β-lipoprotéine. Il a donc fallu attendre d'avoir des préparations très pures d'anticorps pour réaliser la précipitation dans de bonnes conditions.

Pour mettre en évidence la spécificité anti-α-lipoprotéine, nous avons employé des antigènes très purs, obtenus par les procédés mis au point au laboratoire. Ces antigènes ne donnent qu'un seul arc en double diffusion en gel d'agarose et, injectés au lapin, ils induisent la formation d'un seul anticorps. Nous avions aussi la γ A myélomateuse purifiée selon le protocole à l'oléate de sodium.

Nous avons étudié les réactions spécifiques par les méthodes de double diffusion d'Ouchterlony, d'immuno-électrophorèse, d'hémagglutination passive (HAP).

...

Nous avons observé que :

a) L'immunoglobuline γ A purifiée à partir des complexes circulants des sérums GER... ou SOR... réagit avec les α et les β-lipoprotéines purifiées et donne avec chacun de ces antigènes des arcs de précipitation en double diffusion en agarose (Fig. 23). Les arcs obtenus avec les α et les β-lipoprotéines se raccordent sans solution de continuité et sans spicule, en donnant une image d'identité. Cependant, avec un sérum humain total, on obtient souvent deux arcs distincts qui, au lavage, tendent à se confondre en un seul, plus diffus.

b) Si l'on fait préalablement migrer les α et les β-lipoprotéines purifiées en électrophorèse, on constate que l'arc obtenu avec la globuline purifiée est bien en position β pour la β-lipoprotéine, et en position α pour l'α-lipoprotéine. On obtient les mêmes arcs, dans les mêmes positions si l'on fait migrer un sérum humain total, au lieu des antigènes purs.

c) L'immunoglobuline purifiée donne en hémagglutination passive des réactions positives avec les α et les β-lipoprotéines. On peut inhiber ces réactions aussi bien avec de petites quantités de β-lipoprotéines ou d'α-lipoprotéines et il faut environ une quantité double de β-lipoprotéines, mesurée en Lowry, pour inhiber complètement une même quantité d'anticorps (Tableau X).

d) De grandes quantités de γ-globulines, d'albumine et de sérum humain débarrassé de ses lipoprotéines ne donnent aucune inhibition.

e) Les immunsérums de lapin anti-β-lipoprotéines étudiés comparativement, ne donnent pas de réactions de précipitation avec les α-lipoprotéines et ne sont pas inhibés par elles.

...

Fig. 23 : Double diffusion en gel d'agarose. Dans les rosettes, on a mis : A la périphérie, beta-lipoprotéine (b), alpha-lipoprotéine (a), albumine (o), gamma-globulines humaines (g), sérum humain sans lipoprotéines (c), beta-lipoprotéines de lapin (bl) ; Au centre, de gauche à droite, l'anticorps anti-Lp Pg GER... purifié non épuisé (eg), épuisé par la beta-lipoprotéine (egb) ou l'alpha-lipoprotéine (ega).

TABLEAU X

INHIBITION d'HEMAGGLUTINATION PASSIVE

	Quantité (en µg) de β et d'α-Lp purifiées qui inhibent 10 unités HAP +++ avec la β Lp comme antigène présent sur les hématies			
	Cas GER...		Cas SOR...	
	β-Lp	α-Lp	β-Lp	α-Lp
Sérum entier	-	-	-	-
Sérum sans lipoprotéines	5	2,5	-	-
Anticorps extrait du complexe formé avec les lipoprotéines	5	2,5	5	2,5

IV. - L'ANTIGENE Pg :

Tous les résultats précédents et en particulier l'existence des réactions de précipitation et d'hémagglutination avec la globuline myélomateuse et les antigènes purs, prouvent qu'il s'agit bien de réactions spécifiques et surtout qu'il existe une spécificité commune aux α et aux β-lipoprotéines du sérum du patient lui-même, ou isolées à partir d'un mélange de sérums humains normaux. Nous avons retrouvé cette spécificité dans tous les pools de lipoprotéines étudiés, sur les lipoprotéines de 134 hommes, normaux ou xanthomateux.

Nous l'avons aussi retrouvée sur les lipoprotéines de tous les animaux que nous avons étudiés : lapin, cobaye, rat, chien, cerf, vigogne, antilope, boeuf, porc, mouton, poulet, carpe, truite.

Puisque toutes les lipoprotéines étudiées, humaines ou animales, sont précipitées par l'IgA anticorps, il ne s'agit pas d'une spécificité isotypique. Elle est différente de celles qui induisent la formation d'anticorps chez les animaux hyperimmunisés avec du sérum humain et les sérums de lapin anti-β-lipoprotéines humaines étudiés ici ne la reconnaissent pas. Il ne s'agit pas non plus d'une spécificité allotypique du genre de celles déjà observées pour les γ-globulines du sérum de lapin par OUDIN (100) et pour les β-lipoprotéines d'homme par ALLISON et BLUMBERG (64). Il s'agit donc d'une spécificité nouvelle, inconnue jusqu'ici, dont l'existence montre que les lipoprotéines du sérum humain possèdent, comme l'albumine étudiée par LAPRESLE (101), plusieurs sortes de groupements spécifiques et que les α et β-lipoprotéines ont au moins un groupement commun dont l'origine doit remonter à une étape de la phylogénèse très antérieure à celle de la différenciation de l'espèce humaine. Ce groupement

...

pourrait être un fragment d'une matrice commune à ces deux protéines, auquel les groupements spécifiques de l'espèce (isotypiques) et des individus (allotypiques) se sont ajoutés ensuite. Nous avons appelé ce groupement l'antigène Pg : P en référence à sa possible spécificité phylotypique et g en référence au premier homme (Monsieur GER...) chez lequel un anticorps anti-Pg a été trouvé.

Cette spécificité, qui est normalement tolérée par les différentes espèces qui la possèdent, n'est pas reconnue par les antisérums couramment utilisés en immunologie.

CHAPITRE VI :

MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE D'UN PHOSPHOLIPIDE DANS LE SITE Pg

Différentes méthodes directes permettent en immunochimie de mettre en évidence et d'étudier la réaction antigène-anticorps. On peut citer : les techniques de précipitation, d'agglutination, de fixation du complément, d'équilibre de dialyse, par exemple. Mais on peut aussi employer des méthodes indirectes. Ces dernières font appel à la compétition d'un antigène et d'un haptène, ou de deux haptènes pour un même site anticorps ; ou aussi à la compétition de deux anticorps pour un même groupe antigénique. Les méthodes indirectes sont surtout utilisées quand la réaction n'est pas visible avec évidence. Leur principe est la mesure de leur effet sur l'une ou l'autre des réactions directes antigène-anticorps. L'utilisation d'haptènes dont la structure est connue et la comparaison des résultats obtenus avec les autres haptènes, permet ainsi de déterminer progressivement la structure du groupe antigénique.

Dans notre travail, nous avons cherché à approcher la structure du site lipoprotéique Pg par la technique d'inhibition de l'hémagglutination passive par différents haptènes.

I. - RECHERCHE de SUBSTANCES ACTIVES :

Pour cette recherche, nous avons utilisé les méthodes classiques d'inhibition des réactions antigène-anticorps (102). Comme antigène, nous avons employé des β-lipoprotéines humaines purifiées (82) et, comme anticorps, le sérum sans lipoprotéines du cas de myélome GER..., ainsi que l'IgA anti-Pg isolée et purifiée à partir de ce sérum (77).

...

La méthode d'inhibition de l'hémagglutination passive (HAP) a permis de procéder au dépistage des substances actives. Pour ce test, nous avons utilisé une quantité d'anticorps équivalant à environ 2 unités hémagglutinantes +++ et des hématies de lapin, sur lesquelles nous avons fixé par l'intermédiaire de la benzidine diazotée (89) les β-lipoprotéines purifiées.

L'inhibition a été recherchée par l'incubation de la solution d'anticorps avec des dilutions sériées de chaque substance étudiée. Nous avons recherché systématiquement pour les substances actives :

a) l'inhibition de la réaction de précipitation en gel d'agarose selon Ouchterlony (88) ;

b) l'inhibition de la précipitation en solution saline selon le procédé décrit par KABAT (102) ;

c) la resolubilisation des précipités préparés en mélangeant préalablement en solution saline des β-lipoprotéines et l'IgA anti-Pg.

d) l'inhibition de la réaction d'un immunsérum de lapin anti-β-lipoprotéines humaines.

Les substances étudiées ont été solubilisées, soit dans du sérum physiologique, soit dans une solution à 0,1 % d'albumine délipidée, celle-ci n'étant pas inhibitrice à la concentration choisie.

Nous avons testé ainsi un grand nombre de molécules simples : des sucres, des dérivés des sucres, des acides aminés, des alcaloïdes, des acides biliaires, des stérols, des stéroïdes, des bases puriques et pyrimidiques, des tweens, des phospholipides du commerce, des lipides et des phospholipides extraits des β-lipoprotéines humaines purifiées au laboratoire.

...

Les différents lipides obtenus à partir des β-lipoprotéines ont été extraits selon la technique de FOLCH (103). Après extraction, ces lipides ont été séparés par chromatographie en couche mince de silicagel avec un mélange de solvants : éther/hexane/acide acétique : 30/70/1. Les différentes taches, après localisation par des vapeurs d'iode, ont été éluées par un mélange chloroforme/méthanol/eau : 50/50/15. Les phospholipides ainsi obtenus et les phospholipides du commerce ont été séparés et purifiés par une chromatographie sur couche mince de silicagel, avec un mélange de solvants : chloroforme/méthanol/acide acétique/eau : 50/23/7/5. Les différentes taches obtenues ont été localisées et éluées de la même façon que précédemment.

Dans le cas des phospholipides, leur évaluation quantitative a été faite par dosage du phosphore après minéralisation selon FISKE et SUBARROW (95)

II. - RESULTATS :

La plupart des petites molécules n'ont pas inhibé l'HAP, même à des concentrations de 1 %. Il en est ainsi pour tous les sucres (sauf le L-glucose qui est légèrement inhibiteur) et la plupart des acides aminés, des bases puriques et pyrimidiques, des acides biliaires et des alcaloïdes.

Cependant, alors que le benzoate de soude et la caféine sont peu inhibiteurs, le benzoate de caféine l'est beaucoup plus (Tableau XI). Ce composé inhibe aussi la précipitation en gel d'agarose et, en solution concentrée ($> 0,5$ M), il permet la redissolution des précipités déjà formés.

Les tweens étudiés (tween 20, 40, 60, 80) inhibent très bien la réaction d'HAP dans le système Pg $\rightleftharpoons$ anti-Pg : dilués au 1/256 000e, ils inhibent encore totalement 2 unités hémagglutinantes d'anticorps. Ces composés inhibent complètement la précipitation en agarose des β-lipoprotéines par l'anticorps anti-Pg.

...

TABLEAU XI

Substances étudiées	Quantité nécessaire pour inhiber totalement la réaction d'HAP +++ dans le système Pg ⟷ anti-Pg (en µg/0,5 ml/2 U. HAP +++ d'anticorps)	
	En solution aqueuse physiologique	En solution physiologique contenant 0,1 % d'albumine
Sucres :		
- glucose - saccharose - N-acétyl-glucosamine - sorbitol - inositol	> 5 000	
- L-fucose	1 250	
Benzoate de sodium	2 500	
Caféine	-	1 250
Citrate de caféine	1 000	
Benzoate de caféine . . .	30	
Albumine humaine	> 10 000	

Ce sont les phospholipides qui ont de loin le plus grand pouvoir inhibiteur (Tableau XII) : 2,5 µg d'extrait phospholipidique total, obtenu à partir de β -lipoprotéines, en solution aqueuse inhibent totalement l'activité de 2 unités d'HAP anti-Pg.

Parmi les préparations commerciales, c'est la lyso-lécithine qui a la plus grande activité inhibitrice : 0,06 µg produisent une inhibition totale. L'emploi d'une émulsion synthétique, très peu inhibitrice par elle-même, suggère que la sphingomyéline est nettement inhibitrice, alors que la phosphatidyl-éthanolamine, la DL- α -phosphatidyl-choline et la DL- α -céphaline le sont peu ou pas.

La lysolécithine en solution aqueuse physiologique permet de redissoudre des précipités déjà formés et elle inhibe aussi la précipitation en gel d'agarose. En solution saline, le taux d'inhibition atteint 90 % de la précipitation obtenue en mélangeant 500 µg d'IgA anti-Pg et 100 µg de β -lipoprotéines.

Le benzoate de caféine, les tweens, les phospholipides, et notamment la lysolécithine n'inhibent pas l'immunsérum de lapin anti- β -lipoprotéines humaines.

III. - CONCLUSIONS :

Des faits qui précèdent, on peut déduire apparemment qu'un phospholipide entre dans la constitution du site Pg commun aux α et aux β -lipoprotéines du sérum. Cela s'accorde bien avec ce que l'on sait de leurs structures qui diffèrent surement par leur apoprotéine, mais dont la partie lipidique renferme les mêmes phospholipides. Cela confirme aussi, s'il en est besoin, qu'une partie au moins des phospholipides occupent la surface de ces lipoprotéines, où ils peuvent réagir avec l'anticorps anti-Pg.

...

TABLEAU XII

Substances étudiées	Quantité nécessaire pour inhiber totalement la réaction d'HAP +++ dans le système Pg ⟷ anti-Pg (en µg/0,5 ml/2 µ. HAP +++ d'anticorps)	
	En solution aqueuse physiologique	En émulsion avec des triglycérides, des lécithines de soja et du sorbitol (xxxx)
Beta-lipoprotéines humaines (x)	1,5	
Phospholipides (xx)		
a) extraits des beta-Lp	2,5	
b) préparations commerciales :		
- DL-α-phosphatidyl-choline	> 100 (xxx)	> 12,5
- DL-α-céphaline	> 100 (xxx)	> 12,5
- Sphingomyéline	> 100 (xxx)	0,5
- Phosphatidyl-éthanol-amine	78	> 12,5
- Lysolécithine	0,06	0,25

(x) en µg de polypeptide dosé selon Lowry
(xx) en µg de phospholipides
(xxx) solutions incomplètes : émulsions opalescentes
(xxxx) utilisée seule, cette émulsion est très peu inhibitrice.

Les préparations commerciales de phospholipides ont un pouvoir inhibiteur différent. La lysolécithine est très active, mais on ne peut pas encore conclure qu'elle soit présente dans le site Pg, car elle a une très forte action détergente qui pourrait produire à elle seule des inhibitions par réaction avec un antigène lipidique plutôt que par blocage direct du site anticorps.

Ces expériences nous permettent tout de même de penser que le site Pg fait probablement partie d'une série de sites "phospholipidiques" dont la plupart restent à découvrir. L'antigène de Wasserman (104), ainsi que celui qui caractérise certains virus (105) pourraient entrer dans cette catégorie.

CHAPITRE VII :

LES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DU FRAGMENT LIPOPROTEIQUE INHIBITEUR

Le fait que le site Pg se trouve sur les α et β-lipoprotéines du sérum de tous les hommes et de tous les animaux que nous avons étudiés, donne un grand intérêt à l'étude de sa structure. Cette étude semble d'autant plus intéressante que le site Pg pourrait bien être une pièce essentielle dans la liaison lipides-protéines des lipoprotéines.

Nous avons essayé de déterminer certaines caractéristiques physico-chimiques du site Pg : la stabilité du pouvoir inhibiteur Pg dans diverses conditions, le contenu lipidique des extraits inhibiteurs, l'action de divers enzymes sur la molécule de β-lipoprotéine entière et sur l'extrait inhibiteur obtenu par l'éther.

I. - METHODES :

Nous avons étudié le comportement du site Pg, soit sur des β-lipoprotéines purifiées (82), soit sur une fraction inhibitrice préparée à partir des β-lipoprotéines purifiées. Puis, nous avons testé l'activité ou étudié la composition des fractions obtenues par différentes méthodes.

1° Préparation de la fraction inhibitrice :

Cette fraction est préparée à partir de lipoprotéines purifiées, par des extractions par l'éther ou l'éther-méthanol en proportions variées : la solution de β-lipoprotéines est mise en contact soit avec l'éther, soit avec l'éther-méthanol à 0° C. A 1,5 ml de solution de β-lipoprotéines contenant 2 500 µg de protéines par ml (93), on ajoute 2 ml de solvant dans

...

un tube à hémolyse. On agite fortement, on laisse reposer ; on répète trois fois l'opération, puis on centrifuge et on recueille la phase supérieure éthérée, qui contient la plus grande partie des lipides, et la phase inférieure aqueuse qui est ensuite réextraite plusieurs fois selon le protocole précédent par le solvant. Les extraits éthérés sont évaporés sous vide à froid, pas tout à fait à sec, et repris dans 1 ml d'eau physiologique. On obtient une émulsion qui, après centrifugation est séparée d'une couche jaune qui flotte, constituée de lipides insolubles dans l'eau physiologique. Cette solution contient le site Pg.

2° Etude de la fraction inhibitrice :

Pour cette étude, nous avons utilisé la méthode d'extraction par l'alcool-éther à - 20° C (94). On ajoute à 10 ml d'un mélange éthanol-éther : 3/1, goutte à goutte en agitant, 1 ml de solution à extraire. On laisse ainsi en contact 16 heures à - 20° C. La protéine précipite. On centrifuge 10 mn à 4 000 t/mn. On décante la phase organique, puis on lave le précipité 2 fois avec le mélange alcool-éther, en laissant en contact à - 20° C trois heures avant chaque centrifugation , et une fois avec l'éther seul, en laissant en contact une nuit à - 20° C. On remet à la température du laboratoire et on resolubilise le précipité de protéines dans une solution physiologique.

3° Détection du site Pg :

Pour détecter et évaluer le site Pg dans les β -lipoprotéines et les extraits, on a pris pour test l'inhibition de l'activité de l'anticorps anti-Pg, mise en évidence soit par la méthode d'hémagglutination passive au chlorure de chrome (90), soit par la méthode d'AELA (92).

...

b) Extraction par des mélanges éther-méthanol : l'effet de la concentration du méthanol à 10, 20, 30 et 50 % dans l'éther a été étudié.

Pour une concentration de 10 % de méthanol , l'extraction est semblable à celle produite par l'éther seul. Elle diminue au fur et à mesure que la proportion de méthanol croit (Fig. 24). Il s'agit d'une destruction de la fraction inhibitrice par le méthanol, car le pouvoir inhibiteur du résidu aqueux de l'extraction diminue aussi avec l'augmentation du pourcentage de méthanol.

c) Si après 10 extractions successives par l'éther seul, on reprend le résidu aqueux encore inhibiteur, on constate qu'un peu d'inhibiteur est de nouveau extrait par un mélange éther-méthanol à 6 %. Après 5 extractions avec ce mélange, tout pouvoir inhibiteur a disparu des extraits et du résidu aqueux. D'après ces résultats, on peut penser que la fraction Pg extraite par les solvants des lipides existe sous deux formes :

- une forme assez peu liée au reste de la molécule de β-lipoprotéines, puisque l'éther suffit à l'en séparer ;
- une forme plus solidement liée, nécessitant la présence de méthanol pour rompre la liaison avec la molécule de β-lipoprotéine.

La première forme semble quantitativement beaucoup plus importante.

2° Influence de divers paramètres sur l'extraction par l'éther seul (Tableau XIII)

L'influence des paramètres suivants a été étudiée :

- le pH de la solution de β-lipoprotéines utilisée ;
- la molarité du milieu d'extraction ;
- la température du milieu d'extraction ;
- le temps de contact de la solution de lipoprotéines et du solvant avant l'extraction.

...

TABLEAU XIII

Paramètres dont l'influence sur l'extraction de la fraction inhibitrice par l'éther-méthanol à 6 % a été étudiée		Quantité de fraction inhibitrice extraite mesurée par le degré d'inhibition de la réaction d'HAP dans le système Pg ⟷ anti-Pg
pH auquel a été faite l'extraction	2	0
	4	±
	6	+
	8	++
	10	+++
	12	0
Molarité de la solution de beta-lipoprotéines	0,15 M	+++
	0,25 M	+++
	0,50 M	+++
	0,75 M	+++
	1 M	++
	1,5 M	±
	2 M	±
Température à laquelle a été faite l'extraction	Dans la glace	+++
	A 22° C	++
Temps de contact entre la solution de beta-lipoprotéines et la solution d'extraction	1 mn	+
	24 h	++
	48 h	+++

0 : pouvoir inhibiteur nul
+++ : " " maximum

Pour toutes ces expériences, on a pratiqué trois extractions successives par l'éther seul et réuni les trois extraits obtenus.

a) Le pH d'extraction : Pour cette étude, les β-lipoprotéines ont été mises en milieu tamponné par dialyse une nuit à 4° C contre le tampon choisi, ajusté au pH désiré. On a étudié l'influence du pH entre 2 et 12. Pour les pH compris entre 2 et 7, on a utilisé du tampon véronal et pour les pH compris entre 8 et 12 du tampon glycocolle. On a constaté que l'extraction était nulle à pH 2 et pH 12, qu'elle augmentait de pH 4 à pH 10, le maximum se situant à pH 10 (Fig. 25).

b) La molarité du milieu d'extraction : A l'aide de chlorure de sodium cristallisé, on a amené la molarité de la solution de β-lipoprotéines aux valeurs suivantes : 0,15 M ; 0,25 M ; 0,75 M ; 1 M ; 1,5 M ; 2 M. Après extraction par l'éther, la quantité de fraction inhibitrice obtenue est constante entre 0,15 M et 0,75 M, puis décroit pour des molarités en chlorure de sodium supérieures (Fig. 26).

c) La température d'extraction : On a comparé le rendement d'une extraction à 0° C et celui d'une extraction à 22° C ; l'augmentation de la température entraine une diminution du rendement de l'extraction (Fig. 27).

d) La durée du contact entre la solution de β-lipoprotéines et l'éther Des temps de contact de 1 minute à 48 heures ont été essayés. L'extraction est d'autant plus efficace que le temps de contact est plus long. (Fig. 28)

III. - STABILITE du POUVOIR INHIBITEUR (Tableau XIV)

1° Stabilité du pouvoir inhibiteur de la solution de β-lipoprotéines :

a) Action de la température sur la solution de β-lipoprotéines avant l'extraction : Après 48 heures de conservation de la solution de β-lipoprotéines soit à - 20° C, soit à 22° C, soit à 37° C, le rendement de l'extraction

...

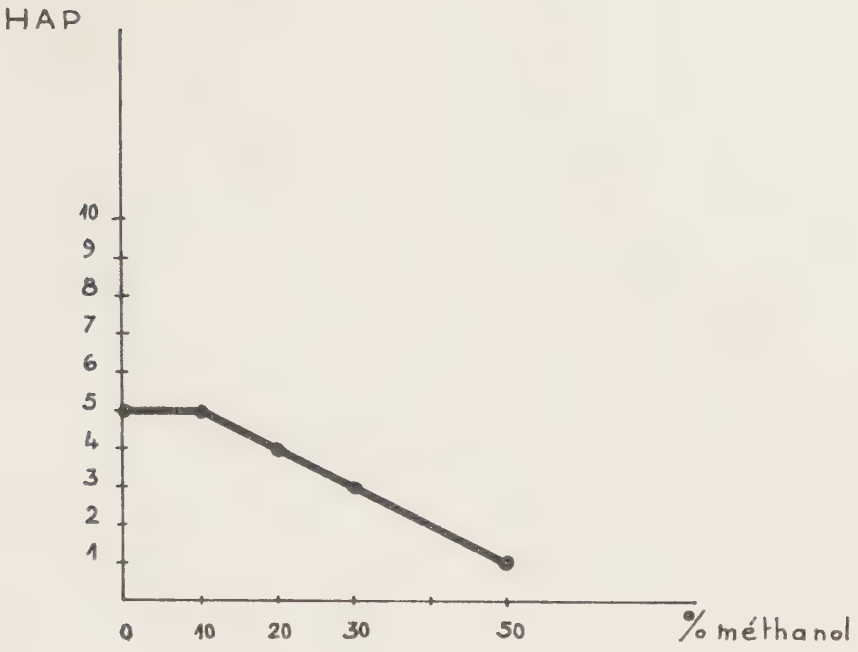


Fig. : 24 Evolution du pouvoir inhibiteur Pg extractible d'une solution de beta-lipoprotéines, en fonction de la concentration en méthanol du solvant utilisé pour l'extraction. Le pouvoir inhibiteur a été évalué d'après le nombre de trous de la plaque d'hémagglutination passive (HAP) dans lesquels on a observé une inhibition totale de l'anticorps anti-Pg par l'extrait inhibiteur.

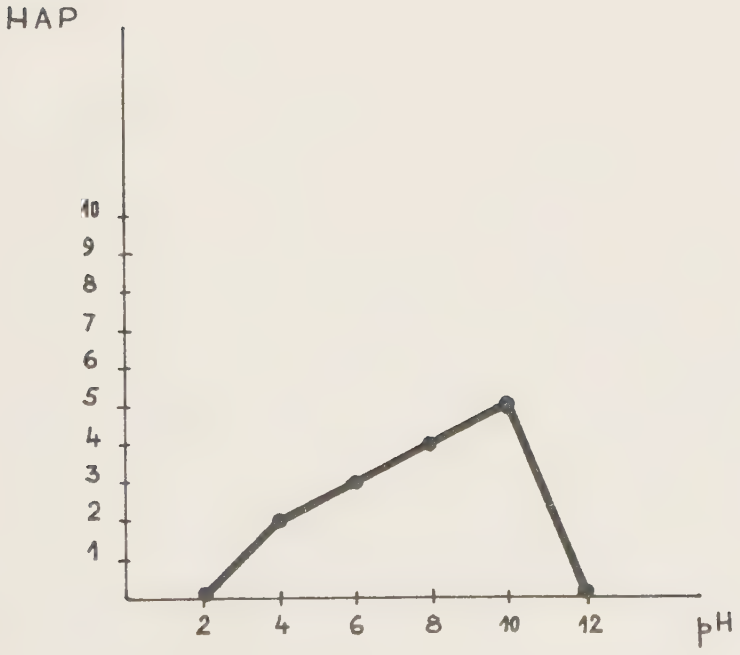


Fig. 25 : Evolution du pouvoir inhibiteur Pg extractible d'une solution de beta-lipoprotéines, en fonction du pH auquel a été faite l'extraction.

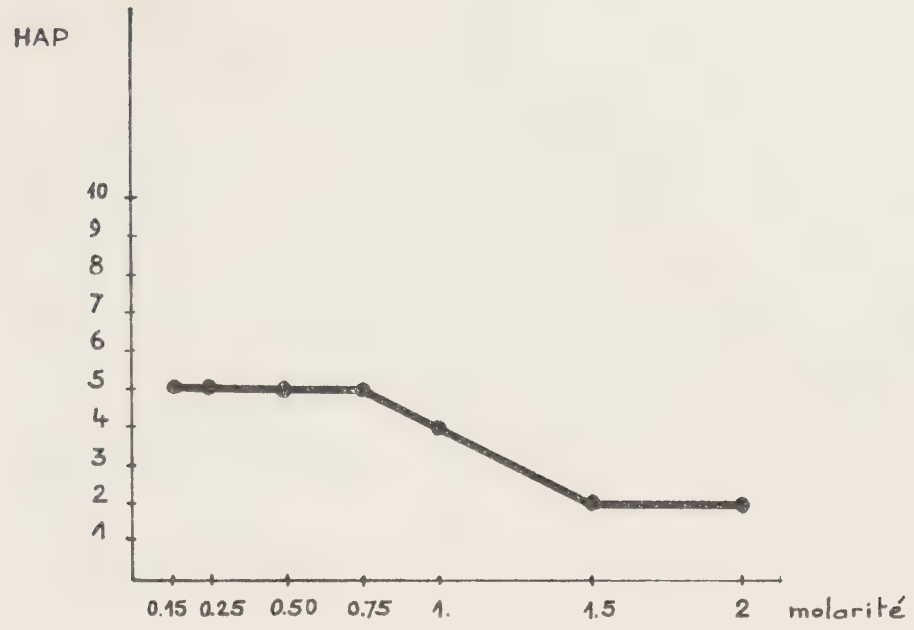


Fig. 26 : Evolution du pouvoir inhibiteur Pg extractible d'une solution de beta-lipoprotéines, en fonction de la molarité de la solution de beta-lipoprotéines.

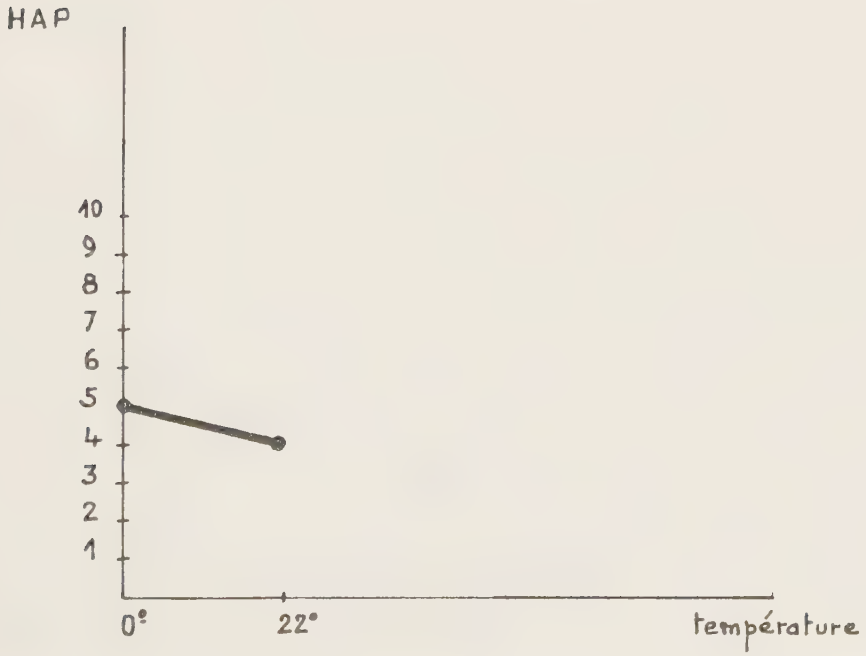


Fig. 27 : Evolution du pouvoir inhibiteur Pg extractible d'une solution de beta-lipoprotéines, en fonction de la température à laquelle est faite l'extraction.

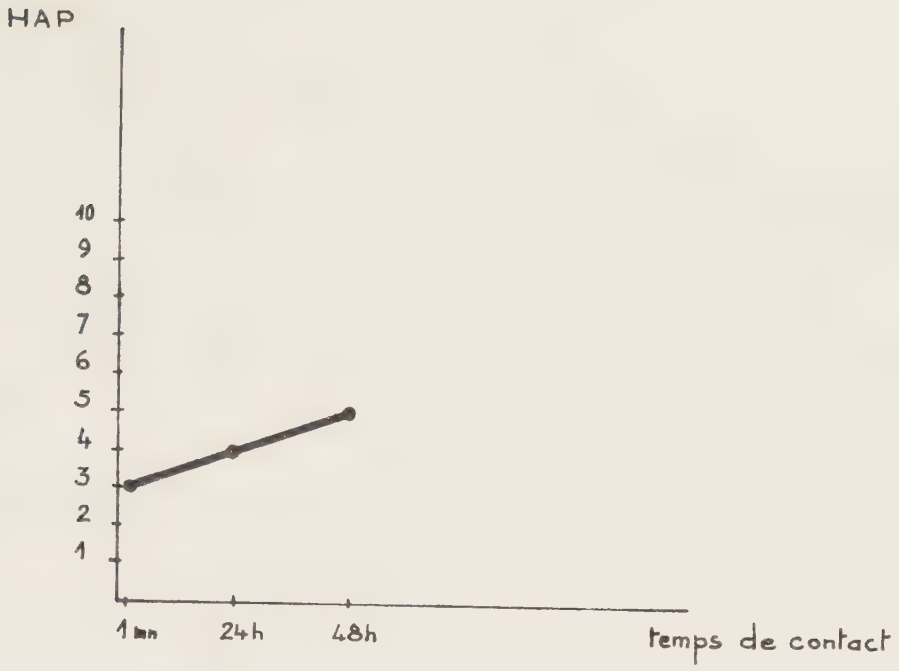


Fig. 28 : Evolution du pouvoir inhibiteur Pg extractible d'une solution de beta-lipoprotéines en fonction du temps de contact entre la solution de beta-lipoprotéines et le solvant utilisé pour l'extraction.

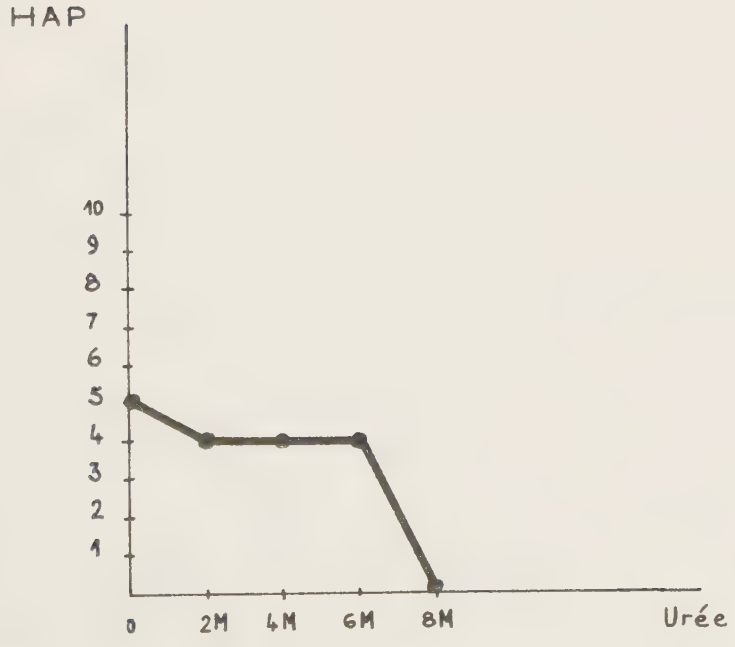


Fig. 29 : Evolution du pouvoir inhibiteur Pg extractible d'une solution de beta-lipoprotéines en fonction de la concentration en urée de la solution de beta-lipoprotéines.

TABLEAU XIV

Agents dont l'influence sur le pouvoir inhibiteur a été étudiée		Stabilité de l'inhibiteur dans la réaction d'inhibition d'HAP du système Pg ⟷ anti-Pg sous l'influence de divers agents sur :	
		(1) Beta-lipoprotéine entière	(2) Fraction inhibitrice éthéro-soluble
Température	- 20° C (4 h)	+	+
	22° C "	+	+
	37° C "	+	+
	56° C (1 h)	+	+
	100° C (1 h)	0	±
Lyophilisation		+	
Urée	2 M	±	
	4 M	+	
	6 M	±	
	8 M	0	
Mercapto-éthanol		+	
Oléate de sodium		+	
Méthanol		0	
Conservation à 4° C			
- dans le chloroforme			0
- en solution aqueuse			+
- à pH 2			0

+ : pouvoir inhibiteur conservé
0 : " " détruit
± : " " diminué

reste le même. Après une heure d'incubation à 56° C ou après lyophilisation de la solution de β-lipoprotéines, il n'y a pas non plus de modification de l'extraction. Après ébullition, on n'extrait plus de fraction inhibitrice.

b) Action de l'urée, du mercapto-éthanol, de l'oléate de sodium sur la solution de β-lipoprotéines : En urée 2 M, 4 M, 6 M, l'extraction de la fraction inhibitrice est en partie bloquée ; en urée 8 M, l'extraction est complètement bloquée : tout le pouvoir inhibiteur se trouve dans la phase aqueuse inférieure (Fig. 29).

Le mercapto-éthanol, l'oléate de sodium, ajoutés à la solution de β-lipoprotéines n'ont aucune action sur l'extraction.

2° Stabilité du pouvoir inhibiteur de la fraction inhibitrice isolée :

a) Action de la température : Il n'y a aucune modification de la valeur de l'inhibition après conservation de la fraction inhibitrice à - 20° C, 22° C et 37° C. Par contre, après passage pendant une heure de la fraction inhibitrice à 56° C ou à 100° C, l'inhibition diminue et devient incomplète : l'inhibiteur est partiellement détruit par la chaleur.

b) Conservation de la fraction inhibitrice : Après trois mois de conservation à 4° C dans de l'eau physiologique, la fraction inhibitrice conserve tout son pouvoir inhibiteur.

c) Action du pH sur la conservation de la fraction inhibitrice : La fraction inhibitrice conservée à 4° C à pH 2 perd son pouvoir inhibiteur au bout de 24 heures.

IV. - COMPOSITION de l'INHIBITEUR EXTRAIT à PARTIR des β-LIPOPROTEINES par l'ETHER :

1° Gel-filtration : La fraction inhibitrice n'est retardée ni en Séphadex G200, ni en Séphadex G 50. Il semble donc s'agir d'une grosse micelle.

...

2° Chromatographie en couche mince :

A l'issue de la chromatographie en couche mince de la fraction inhibitrice obtenue par l'éther-méthanol à 6 %, on obtient avec le mélange de solvants permettant de séparer les divers phospholipides, un phospholipide inhibiteur dont le Rf est de 0,34 identique à celui de la sphingomyéline.

3° Délipidation par l'éthanol-éther à - 20° C :

La délipidation par l'éthanol-éther à - 20° C de l'extrait inhibiteur obtenu par l'éther, permet de séparer les lipides qui passent dans la phase organique, des peptides qui précipitent.

a) Les peptides : Le précipité peptidique, après dissolution dans une solution physiologique, donne la réaction de Lowry. Ces peptides ne possèdent aucun pouvoir inhibiteur et, d'après leur volume d'élution en gel-filtration sur Séphadex, ils ont un poids moléculaire inférieur à 5 000.

b) Les lipides : Les lipides obtenus sont inhibiteurs. Leur analyse en couche mince de silicagel, permet de mettre en évidence des acides gras non inhibiteurs et des phospholipides inhibiteurs. Parmi ces phospholipides, on trouve trois fractions :

- une fraction non inhibitrice, qui contient de la lysolécithine à l'état de traces ;
- une fraction non inhibitrice peu importante qui contient de la lécithine ;
- une fraction abondante et très inhibitrice, qui a un Rf de 0,34 identique à celui de la sphingomyéline.

La fraction inhibitrice totale, extraite par l'éther-méthanol à 6 %, la partie lipidique obtenue par extraction à - 20° C, le phospholipide

...

de Rf 0,34 isolé par chromatographie en couche mince à partir de cette fraction, possèdent le même pouvoir inhibiteur : il faut dans les trois cas, 0,38 µg de phosphore pour inhiber totalement une même quantité d'anticorps anti-Pg. Les peptides n'augmentent donc pas l'activité inhibitrice. Ils semblent cependant jouer un rôle dans la stabilité du pouvoir inhibiteur : la fraction lipidique isolée à - 20° C en solution aqueuse perd son activité au bout d'un mois, alors que la fraction inhibitrice totale en solution aqueuse extraite par l'éther-méthanol, a toujours la même activité au bout de trois mois.

Dans la fraction inhibitrice totale, les dosages de phospholipides et de polypeptides montrent que le rapport polypeptides/phospholipides est voisin de 1.

V. - ACTION INHIBITRICE des PHOSPHOLIPIDES du COMMERCE

Nous avons étudié le pouvoir inhibiteur de préparations commerciales et de phospholipides purifiés par chromatographie en couche mince à partir de leurs préparations commerciales.

1° Les préparations commerciales :

- La lysolécithine, la sphingomyéline, la phosphatidyl-éthanolamine sont inhibitrices ;

- La lécithine, le phosphatidyl-inositol n'ont aucun pouvoir inhibiteur

2° Les phospholipides obtenus en chromatographie en couche mince :

- A partir de la lysolécithine, nous avons obtenu deux bandes, dont une seule, de Rf 0,25, inhibitrice ;

...

- A partir de la sphingomyéline, nous avons obtenu quatre bandes, dont une de Rf 0,34 inhibitrice ;

- A partir de la phosphatidyl-éthanolamine, nous avons obtenu deux bandes, dont une de Rf 0,72 inhibitrice ;

- A partir de la lécithine, et du phosphatidyl-inositol, nous n'avons obtenu aucun phospholipide inhibiteur.

VI. - ACTION de QUELQUES PROTEASES sur le POUVOIR INHIBITEUR de la β -LIPOPROTEINE ou du FRAGMENT INHIBITEUR EXTRAIT par l'ETHER :

Nous avons étudié l'action de la pronase, de la pepsine, de la trypsine et de la papaïne.

1° Sur la β -lipoprotéine entière :

Après digestion protéolytique, la molécule de β -lipoprotéine est altérée, sa migration électrophorétique est modifiée avec apparition de trainées entre le réservoir de départ et la tache de β -lipoprotéines. Cependans le pouvoir inhibiteur n'est pas détruit, sauf après action de la pepsine, mais il s'agit probablement uniquement de l'effet du pH, puisque cette enzyme agit à pH 2, ce qui suffit pour faire disparaitre le pouvoir inhibiteur.

2° Sur le fragment inhibiteur :

L'activité inhibitrice de la fraction inhibitrice n'est pas modifiée par les enzymes protéolytiques, sauf dans le cas de la pepsine, mais ici il s'agit probablement aussi de l'action du pH.

VIII. - CONCLUSIONS

Les résultats obtenus nous permettent de dire que le site Pg est en grande partie lipidique ou lié à des lipides : il est extractible par l'éther,

...

soluble dans les solvants apolaires, il résiste à la chaleur et à de grandes variations de pH. Nous pouvons aussi conclure que sa structure est complexe car l'inhibiteur Pg se dégrade rapidement à température ordinaire ou à 4° C en solution chloroformique, et il est détruit par le méthanol.

D'après les analyses, le fragment inhibiteur contient surtout un phospholipide et un petit polypeptide qui, à partir de la β-lipoprotéine, passe dans l'éther en restant lié au phospholipide. Mme AYRAULT-JARRIER et ses collaborateurs (106) ont décrit un fragment préparé par délipidation à l'éther de la β-lipoprotéine, le fragment Fe, qu'ils nous ont fourni. Nous avons ainsi pu voir que notre fraction inhibitrice et leur fragment Fe possédaient le même pouvoir qualitatif et quantitatif d'inhiber l'anticorps anti-Pg.

Le polypeptide ne semble pas jouer de rôle dans le pouvoir inhibiteur Pg, car aucune diminution d'activité inhibitrice n'est obtenue après extraction à - 20° C de ce peptide par un mélange d'alcool-éther, ou après digestion enzymatique par les protéases.

Quant au rôle du phospholipide dans l'inhibition, il parait établi par le résultat de l'inhibition après extraction par l'alcool-éther à - 20° C et par le fait que plusieurs phospholipides purifiés par chromatographie en couche mince sont inhibiteurs de l'anticorps anti-Pg.

Cependant, ce fait doit être admis avec réserve en ce qui concerne la lysolécithine dont l'action détergente pourrait produire à elle seule une inhibition de la réaction entre la lipoprotéine et l'anticorps anti-Pg. Du reste, c'est en employant un détergent (oléate de sodium), que nous avons pu réaliser efficacement la préparation d'anticorps pur à partir de complexes antigènes-anticorps (78).

...

Pour essayer de vérifier la présence de phospholipides dans le site Pg, nous avons étudié l'évolution du pouvoir inhibiteur de la lipoprotéine entière et de sa fraction inhibitrice, en présence de phospholipases. Nous avons constaté que :

a) Après action des phospholipases A, C et D, la migration électrophorétique de la β-lipoprotéine était modifiée : la tache correspondant à la β-lipoprotéine est diminuée, surtout dans le cas de la phospholipase C, et une trainée apparait entre le réservoir de départ et cette tache.

b) Le pouvoir inhibiteur de la β-lipoprotéine disparait complètement après action des phospholipases.

Le fait a une certaine valeur, car il contraste avec l'absence d'action des protéases, signalée dans le présent travail. Il reste malheureusement d'interprétation difficile, en raison de nombreuses impuretés contenues dans les phospholipases commerciales que nous avons utilisées.

CHAPITRE VIII :

LES INTERACTIONS MOLECULAIRES PRIMAIRES ENTRE IMMUNOGLOBULINES MYELOMATEUSES ET LIPOPROTEINES : EVALUATION DU NOMBRE DE SITES Pg PRESENTS SUR LES LIPOPROTEINES ET REAGISSANT AVEC LES SITES ANTI-Pg PRESENTS SUR LES IgA MYELOMATEUSES

Le site lipoprotéique Pg est commun aux α et aux β-lipoprotéines sériques. Nous savons qu'il réagit d'une manière spécifique evec les immunoglobulines myélomateuses provenant des cas de myélomes GER... et SOR..., ou avec leurs fragments Fab. Nous avons donc étudié les interactions moléculaires primaires entre immunoglobulines myélomateuses et lipoprotéines, afin d'évaluer le nombre de sites Pg qui entrent en réaction.

Nous avons fait cette étude avec des α et des β-lipoprotéines provenant des sérums de sujets normaux à jeun et en période post-prandiale, avec des α et des β-lipoprotéines provenant des sérums de sujets xanthomateux à jeun, et avec des β-lipoprotéines provenant de différents animaux.

I. - PREPARATION du FRAGMENT Fab :

La digestion des immunoglobulines myélomateuses par la papaïne en présence de cystéine a été faite selon la méthode de PORTER (31), avec des modifications portant sur la quantité de papaïne utilisée et le temps de digestion. La séparation des fragments obtenus après la digestion enzymatique a été faite par une filtration sur une double colonne de Séphadex G 100, suivie d'une chromatographie sur DEAE-cellulose.

...

1° Digestion par la papaïne :

Après purification et lyophilisation, la globuline myélomateuse est reprise en tampon phosphate 0,15 M EDTA pH 7, dont la composition est la suivante :

- solution A : phosphate de potassium monopotassique : 9,078 g p. 1000 ;
- solution B : phosphate de sodium disodique : 11,876 g p. 1000.

On mélange 61 ml de B et 39 ml de A, et on ajoute à la solution ainsi constituée de l'EDTA 0,002 M et du NaCl 0,075 M. Le pH de cette solution est 7. On reprend 25 mg de globuline myélomateuse dans 1 ml de tampon, puis on ajoute de la mercuripapaïne à raison de 2 % du poids de protéines.

On additionne ensuite le mélange de cystéine, pour qu'elle soit à une molarité de 0,01 M. L'hydrolyse enzymatique est faite à 37° C pendant 38 heures La digestion est stoppée dans un bain de glace pendant deux heures, par addition d'une solution d'iodo-acétamide, jusqu'à une concentration finale de 0,011 M. Les produits digérés sont alors dialysés contre une solution physiologique de NaCl pH 7,3 à 4° C pendant une nuit.

2° Filtration sur gel de Séphadex :

Sur deux colonnes de 2,5 cm de diamètre et d'une hauteur de 45 cm, montées en série et conditionnées avec une solution de chlorure de sodium 0,15 M pH 7,3, les produits de la digestion papaïnique sont déposés. L'élution se fait de haut en bas. Des fractions de 2,5 ml sont recueillies après avoir été mesurées automatiquement par absorption à 280 mμ. On note trois pics :

- le premier contient l'immunoglobuline non digérée ;
- le second contient les fragments Fab et Fc ;
- le troisième contient de petits peptides.

...

3° Séparation des fragments Fab et Fc :

Le second pic recueilli par filtration sur Séphadex est dialysé pendant une nuit à 4° C contre un tampon Tris 0,05 M pH 8, puis il est déposé sur une colonne de DEAE-cellulose conditionnée avec le même tampon. La colonne est éluée en tampon Tris 0,005 M pH 8, progressivement enrichi en NaCl de 0,005 M à 0,5 M. Les fractions recueillies sont mesurées en absorption à 280 mμ.

La digestion papaïnique permet d'obtenir deux fractions :

- l'une éluée avec du tampon Tris NaCl 0,1 M ;
- l'autre éluée avec du tampon Tris NaCl 0,5 M.

L'analyse immuno-électrophorétique montre que la première fraction éluée correspond au fragment Fab et possède bien un pouvoir anticorps ; elle entre en réaction avec les lipoprotéines. La seconde fraction, d'après l'analyse immuno-électrophorétique, ne correspond pas au fragment Fc classique, décrit pour les immunoglobulines (Fig. 30).

II. - PROTOCOLE EXPERIMENTAL et METHODE DE CALCUL :

1° Protocole expérimental :

Les interactions moléculaires primaires ont été étudiées par filtration sur gel de Séphadex, en appliquant un procédé déjà classique pour l'étude des interactions entre petites molécules et macromolécules, et aussi entre protéines (107, 47).

Dans les différentes expériences, nous avons choisi le gel de Séphadex de telle sorte que les complexes entre la lipoprotéine et l'anticorps, ainsi que la lipoprotéine seule soient exclus et que l'anticorps seul soit retenu par le gel.

...

Fig. 30 : Immuno-électrophorèse des fractions obtenues après séparation sur DEAE du pic II de la filtration sur Séphadex, d'IgA digérée par la papaïne.

De haut en bas :

- pic II du Séphadex avant passage sur DEAE
- fraction obtenue en DEAE avec le tampon 0,1 M NaCl
- fraction obtenue en DEAE avec le tampon 0,5 M NaCl

révélés par un sérum anti-IgA myélomateuse totale.

Coloration à l'amido-Schwartz.

Nous avons utilisé :

- pour les mélanges entre globulines myélomateuses et β-lipoprotéines, du Séphadex G 200 ;

- pour les mélanges entre globulines myélomateuses et α-lipoprotéines, du Séphadex G 150 ;

- pour les mélanges entre fragments Fab et α ou β-lipoprotéines, du Séphadex G 100.

Toutes les protéines ont été dosées par la méthode de Folin modifiée selon Lowry, après avoir été purifiées par les procédés décrits aux chapitres précédents.

Dans tous les cas, nous avons mis en contact durant une demi-heure, à la température du laboratoire, à pH physiologique dans un volume d'environ 0,5 ml, une quantité fixe d'anticorps avec une quantité variable d'antigène. Après incubation, nous avons déposé le mélange sur une colonne de Séphadex. Le pic exclu du gel contient la quantité de lipoprotéine mise en réaction, augmentée de la quantité d'anticorps fixée sur cette lipoprotéine. La quantité de protéines contenues dans ce pic a été dosée selon la méthode de Lowry.

Les conditions techniques sont les suivantes :

a) nous avons utilisé des colonnes de type 30 x 1,5 (Pharmacia) ;

b) nous avons conditionné et élué nos colonnes de Séphadex avec une solution d'eau physiologique ;

c) nous avons recueilli des fractions de 1 ml par l'intermédiaire d'un collecteur de fractions, et dosé ces fractions par absorption à 280 mμ.

d) Dans toutes nos expériences, la lipoprotéine seule a été filtrée, ainsi que l'anticorps pour vérifier le volume qui permet de les éluer.

...

e) Nous avons utilisé, comme globuline myélomateuse, l'immunoglobuline provenant du cas SOR... ou la forme monomère de l'immunoglobuline myélomateuse GER.. obtenue par réduction de la forme polymère par le mercapto-éthanol.

f) Nous avons choisi les proportions suivantes :

- pour les mélanges anticorps et β -lipoprotéines, 150 µg de globuline myélomateuse et 20, 30, 40 µg de β -lipoprotéines ;

- pour les mélanges anticorps et α -lipoprotéines, 200 µg de globuline myélomateuse et 25, 50, 75 µg d'α -lipoprotéines ;

- pour les mélanges Fab et β -lipoprotéines, 50 µg de Fab et 5, 10, 15 µg de β -lipoprotéines ;

- pour les mélanges de Fab et d'α -lipoprotéines, 50 µg de Fab et 10, 15, 20 µg d'α -lipoprotéines.

g) Nous avons fait nos expériences :

α) pour la molécule entière d'IgA monomère avec :

- Les β -lipoprotéines totales et séparées par ultracentrifugation en β -lipoprotéines de densité 1,006 - 1,019 - 1,063, provenant de pools de sérums normaux, de sérums individuels de sujets normaux à jeun et trois heures après repas, de sérums individuels de sujets xanthomateux à jeun.

- Les α -lipoprotéines provenant des mêmes sérums ;

- Les β -lipoprotéines totales de divers animaux : bovin , porc, mouton, lapin, poulet.

β) pour le fragment Fab : Nous avons évalué le nombre de sites Pg, simplement dans le cas de la β -lipoprotéine totale et de la α -lipoprotéine d'un mélange de sérums normaux.

...

2° Méthode de calcul :

Le rapport molaire entre les protéines qui ont réagi peut être ainsi calculé : la variation de ce rapport en fonction de la concentration des molécules présentes dans le mélange filtré permet, par extrapolation, d'évaluer le nombre de sites Pg qui entrent en réaction. Chaque expérience a été refaite plusieurs fois, avec une excellente reproductibilité. Pour les calculs, on a retenu comme poids moléculaires : $2,5 \times 10^6$ dont 30 % de peptides, pour la β-lipoprotéine ; 300 000 dont 66 % de peptides pour l'α-lipoprotéine ; 180 000 pour l'IgA anti-Pg (mesure faite par la méthode d'équilibre de sédimentation, sous la responsabilité de Mme FILITTI-WURMSER à l'Institut de Biologie Physico-Chimique du CNRS) et 45 000 pour les fragments Fab (108).

Ces poids moléculaires ont été estimés d'après les volumes de sortie de gels de Séphadex G 200 et G 100 calibrés.

La spécificité des réactions a été contrôlée en incluant dans les expériences les témoins suivants : mélanges de lipoprotéines purifiées avec des immunoglobulines de myélomes non anti-lipoprotéines, ou avec des immunoglobulines provenant de sérums normaux ; réactions des immunoglobulines de myélome anti-lipoprotéines avec d'autres protéines.

En outre, une étude systématique des possibilités d'inhibition de chaque réaction a été faite, à l'aide des lipoprotéines purifiées elles-même, ainsi qu'avec d'autres protéines.

III. - RESULTATS :

La filtration sur gel de Séphadex de mélanges en proportions variées des IgA myélomateuses GER... ou SOR... ou de leur fragment Fab et d'α ou de

...

β-lipoprotéines purifiées, permet de constater :

1° que la totalité des molécules myélomateuses purifiées, dans le cas SOR... comme dans le cas GER..., est susceptible de former avec les lipoprotéines, des complexes exclus par le gel, pour peu qu'une quantité suffisante de lipoprotéines soit présente dans le mélange (Fig. 31) ;

2° qu'il y a une relation directe entre le rapport molaire des protéines du mélange soumises à la filtration et le rapport molaire trouvé dans le pic exclu (Fig. 32) ;

3° que le rapport molaire entre l'IgA myélomateuse et les lipoprotéines dans le pic exclu est d'autant plus élevé que le rapport molaire lipoprotéines/IgA myélomateuses dans le mélange à filtrer est plus bas. Dans le cas du fragment Fab, la réaction avec les lipoprotéines suit les mêmes règles que la réaction obtenue avec la molécule entière (Fig. 32).

Les résultats obtenus avec le monomère GER... ou le monomère SOR... sont identiques, de même que ceux obtenus avec leurs fragments Fab.

En extrapolant les rapports molaires trouvés dans la zone d'excès d'anticorps, nous avons constaté que (Tableaux XVI, XVII, XVIII, XIX) :

a) Chez des sujets normaux à jeun, il a été possible de fixer en moyenne sur les β-lipoprotéines de densité 1,006 dix-sept molécules entières monomères d'IgA myélomateuses, sur les β-lipoprotéines de densité 1,063 dix-neuf molécules, alors que sur les β-lipoprotéines 1,019, il n'a pas été possible, sauf dans un cas, de fixer de molécules d'IgA. Sur les α-lipoprotéines, nous avons pu fixer 8 molécules d'IgA.

...

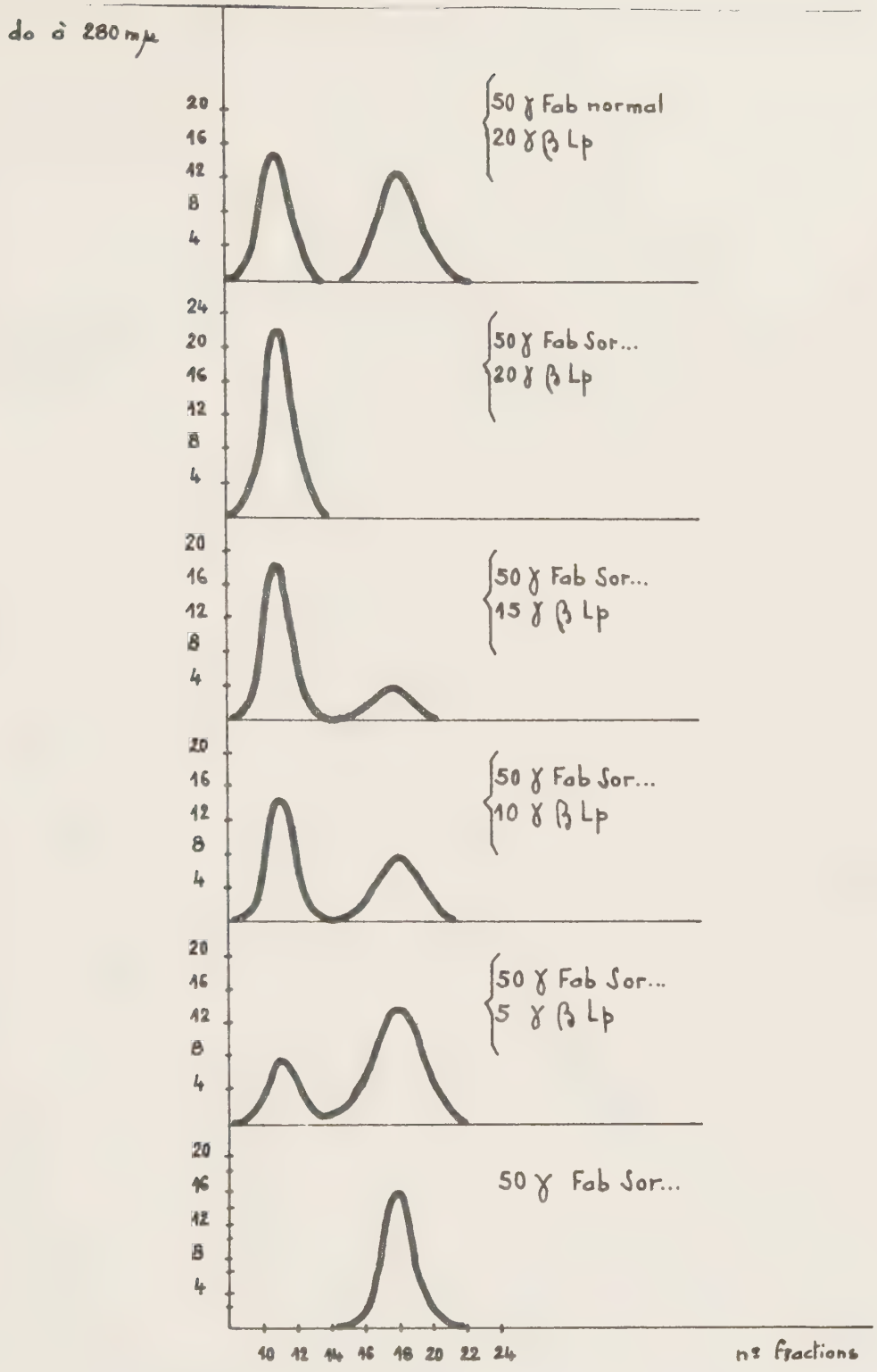


Fig. 31 : Filtration sur Séphadex G 100 de mélanges en proportions variées de beta-lipoprotéines humaines et de fragment Fab provenant de l'IgA anti-Lp Pg du cas SOR... et d'une IgA normale. La beta-lipoprotéine sort de la colonne avec le volume exclu et 50 μg de Fab sont entrainés dans le volume exclu par 20 μg de beta-lipoprotéines, alors que le Fab normal ne semble pas réagir avec la même quantité de beta-lipoprotéines.

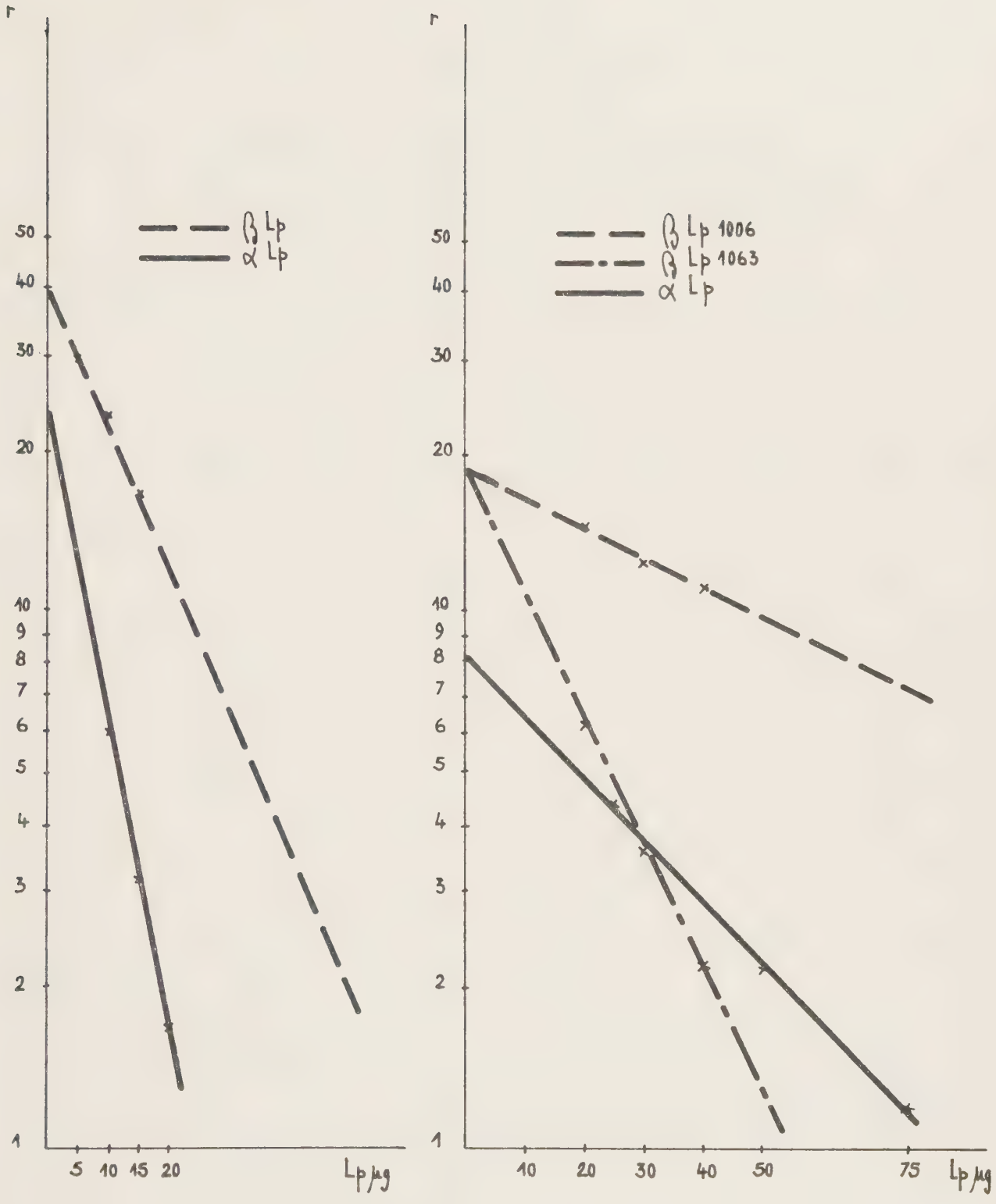


Fig. 32 : Rapports molaires dans le pic exclu, après filtration sur Séphadex du mélange d'IgA anti-Lp Pg purifiées à partir du cas SØR..., avec des beta-lipoprotéines purifiées et des alpha-lipoprotéines purifiées.

r : rapport IgA/Lp dans le pic exclu.

TABLEAU XV

QUANTITE de LIPOPROTEINES HUMAINES RECUEILLIES

dans les DIFFERENTES FRACTIONS d'ULTRACENTRIFUGATION

(en mg)

	Beta-Lp 1,006		Beta-Lp 1,019		Beta-Lp 1,063		Alpha-Lp	
	A jeun	Après repas	A jeun	Après repas	A jeun	Après repas	A jeun	Après repas
Témoins								
N° 1	5,62	-	0,62	-	57,84	-	9,60	-
N° 2	4,48	-	0,64	-	54,21	-	8,98	-
N° 3	4,82	-	0,72	-	60,48	-	9,12	-
N° 4	7,48	8,90	0,88	5,45	56,79	57,62	10,64	5,52
N° 5	5,80	7,30	0,62	0,90	60,52	55,32	4,60	4,82
N° 6	6,24	10,08	1,30	4,96	44,00	57,20	6,00	6,40
N° 7	5,14	6,24	0,98	6,40	56,08	63,26	7,40	4,00
Xanthomateux								
N° 1	7,60	-	4,76	-	64,00	-	4,40	-
N° 2	6,91	-	6,00	-	50,00	-	5,48	-
N° 3	10,66	-	5,56	-	67,00	-	3,84	-
N° 4	4,61	-	7,82	-	85,00	-	6,30	-
N° 5	4,02	-	6,75	-	53,12	-	7,26	-
N° 6	5,21	-	5,96	-	55,20	-	4,28	-
N° 7	7,16	-	6,12	-	61,41	-	6,86	-

TABLEAU XVI

NOMBRE de SITES Pg sans les LIPOPROTEINES du SERUM

de SUJETS NORMAUX à JEUN

(Molécule d'IgA entière)

Témoins	CT g °/oo	PL g °/oo	TG g °/oo	Beta-Lp 1,006	Beta-Lp 1,019	Beta-Lp 1,063	Alpha-Lp
N° 1	2,00	1,90	0,55	19	2	19	9
N° 2	2,00	2,00	0,85	18	0	19	8
N° 3	1,90	2,00	0,70	19	0	20	8
N° 4	2,75	3,00	0,85	16	0	18	9
N° 5	2,75	2,00	0,60	19	20	17	6
N° 6	1,85	2,05	0,55	17	0	18	9
N° 7	2,30	2,30	1,00	19	0	19	8
Moyenne du nombre de sites dans chaque classe de lipoprotéines				18,14	3,14	18,57	8,14
Comparaison des Moyennes				Beta-Lp 1,006 et beta-Lp 1,063	Beta-Lp 1,019 et beta-Lp 1,063	Beta-Lp 1,006 et beta-Lp 1,019	Beta-Lp 1,063 et alpha-Lp
Test t de Student				t = 0,89	t = 4,99	t = 5,57	t=24,23
Signification				N.S.	++	++	+++

TABLEAU XVII

NOMBRE de SITES Pg dans les LIPOPROTEINES du SERUM

de SUJETS NORMAUX à JEUN et après REPAS

(MOLECULE d'IgA ENTIERE)

Témoins	Beta-Lp 1,006		Beta-Lp 1,019		Beta-Lp 1,063		Alpha-Lp	
	A jeun	Après repas	A jeun	Après repas	A jeun	Après repas	A jeun	Après repas
N° 1	19	-	2	-	19	-	9	-
N° 2	18	-	0	-	19	-	8	-
N° 3	19	-	0	-	20	-	8	-
N° 4	16	17	0	17	18	22	9	4
N° 5	19	18	20	20	17	16	6	5
N° 6	17	17	0	16	18	22	9	5
N° 7	19	21	0	11	19	18	8	4
Moyennes	18,14	18,25	3,14	16	18,57	19,5	8,14	4,5
Comparaison des moyennes Test de Student	t = 0,12		t = 3,19 (10,37 sans N° 5)		t = 0,79		t = 6,5	
Signification	N.S.		N.S. (+++ sans N° 5)		N.S.		+++	

TABLEAU XVIII

NOMBRE de SITES Pg dans les LIPOPROTEINES du SERUM

de SUJETS XANTHOMATEUX à JEUN

(Molécule d'IgA entière)

Xanthomateux	CT g °/oo	PL g °/oo	TG g °/oo	Beta-Lp 1,006	Beta-Lp 1,019	Beta-Lp 1,063	Alpha-Lp
N° 1	5,60	4,90	3,70	15	35	16	4
N° 2	4,20	3,00	1,65	23	22	21	4
N° 3	4,90	3,50	2,15	29	11	27	5
N° 4	4,00	4,45	3,80	23	3	20	3
N° 5	4,90	3,95	2,30	15	16	17	-
N° 6	4,55	3,80	1,65	16	17	18	4
N° 7	4,40	4,20	2,05	20	19	19	5
Moyenne du nombre de sites dans chaque classe de lipoprotéines				20,14	17,57	19,71	4,16
Comparaison des Moyennes				Beta-Lp 1,006 et beta-Lp 1,063	Beta-Lp 1,019 et beta-Lp 1,063	Beta-Lp 1,006 et beta-Lp 1,019	Beta-Lp 1,063 et alpha-Lp
Test t de Student				t = 0,53	t = 0,46	t = 0,50	t =10,50
Signification				N.S.	N.S.	N.S.	+++

TABLEAU XIX

NOMBRE de SITES Pg dans les LIPOPROTEINES du SERUM

de SUJETS à JEUN : TEMOINS et XANTHOMATEUX

(MOLECULE d'IgA ENTIERE)

	Beta-Lp 1,006		Beta-Lp 1,019		Beta-Lp 1,063		Alpha-Lp	
	Témoin	Xanth.	Témoin	Xanth.	Témoin	Xanth.	Témoin	Xanth.
N° 1	19	15	2	35	19	16	9	4
N° 2	18	23	0	22	19	21	8	4
N° 3	19	29	0	11	20	27	8	5
N° 4	16	23	0	3	18	20	9	3
N° 5	19	15	20	16	17	17	6	-
N° 6	17	16	0	17	18	18	9	4
N° 7	19	20	0	19	19	19	8	5
Moyennes	18,4	20,14	3,14	17,57	18,57	19,71	8,07	4,14
Comparaison des moyennes Test de Student	t = 0,97		t = 3,09 (4,31 sans n° 5)		t = 0,98		t = 11,55	
Signification	N.S.		N.S. (++ sans n° 5)		N.S.		+++	

b) Chez les mêmes sujets, trois heures après repas, nous avons pu fixer en moyenne 18 molécules sur les β -lipoprotéines de densité 1,006 ; 16 molécules sur les β -lipoprotéines de densité 1,019 ; 20 molécules sur les β-lipoprotéines de densité 1,063 et 5 molécules sur les α -lipoprotéines.

c) Dans le cas d'un mélange de 80 sérums, théoriquement normaux et à jeun, nous avons fixé au maximum 19 molécules entières monomères d'IgA sur les β -lipoprotéines de densité 1,006, 20 molécules sur les β -lipoprotéines de densité 1,063 et 8 molécules sur les α -lipoprotéines.

Avec le fragment Fab, il a été possible de fixer 40 molécules entières sur les β-lipoprotéines de densité 1,063 et 24 molécules sur les α -lipoprotéines.

Une molécule de β -lipoprotéine fixe donc deux fois plus de molécules de Fab que de molécules entières monomères et une molécule d'α -lipoprotéine trois fois plus de molécules de Fab que de molécules entières monomères.

d) Chez des sujets xanthomateux, il a été possible de fixer en moyenne 20 molécules entières de monomère sur les β -lipoprotéines de densité 1,006, 17,5 molécules sur les β -lipoprotéines de densité 1,019, 20 molécules sur les β -lipoprotéines de densité 1,063 et 4 molécules sur les α -lipoprotéines.

e) Chez les animaux, nous avons pu fixer le nombre de molécules entières monomères suivant (Tableau XX) :

- 18 molécules sur les β -lipoprotéines totales de boeuf, de mouton, de porc ;
- 25 molécules sur les β -lipoprotéines de lapin ;
- 12 molécules sur les β-lipoprotéines de poulet.

...

TABLEAU XX

NOMBRE de SITES Pg

sur les BETA-LIPOPROTEINES OBTENUES par ULTRACENTRIFUGATION

du SERUM de DIVERS ANIMAUX

Animaux	Nombre de sites Pg
Boeuf	18
Mouton	18
Porc	18
Lapin	25
Poulet	12

IV. - CONCLUSIONS :

1° Le fait que le site Pg soit commun aux α et aux β-lipoprotéines nous a déjà suggéré qu'une partie au moins de la molécule de ces deux protéines a une structure et donc une origine commune.

2° L'étude comparée des molécules monomères des IgA myélomateuses et de leur fragment Fab nous donne des renseignements très intéressants sur la répartition des sites antigéniques à la surface de la molécule lipoprotéique. L'étude des réactions primaires en gel-filtration de l'IgA anti-Lp P.G. nous a permis de voir que le fragment Fab reconnait deux fois plus de sites sur la β-lipoprotéine et trois fois plus sur l'α-lipoprotéine que la molécule d'IgA monomère entière. Ces différences suggèrent, les α et les β-lipoprotéines ayant une réactivité différente, qu'une partie des sites accessibles au fragment Fab de l'anti-Lp Pg ne l'est pas à la molécule entière. On peut supposer, par exemple, que ces sites sont bloqués sur la molécule, par deux pour la β-lipoprotéine, par trois pour l'α-lipoprotéine (Fig. 33), de telle sorte que la réaction des lipoprotéines avec des molécules d'IgA entières est limitée par l'encombrement stérique ou bien encore que certains sites se trouvent en des points de la surface moléculaire difficilement accessibles aux molécules de grandes dimensions.

3° Il existe une différence entre des sérums provenant de sujets normaux à jeun et de sujets xanthomateux, au niveau des β-lipoprotéines de densité 1,019 : celles-ci ne fixent pratiquement pas de molécules d'IgA chez les sujets normaux à jeun, alors qu'elles en fixent autant que les autres classes de β-lipoprotéines chez les sujets xanthomateux.

...

Fig. 33 : Hypothèse : distribution des sites Lp Pg sur les alpha et les beta-lipoprotéines sériques.

Chez les sujets normaux, cette différence disparait après repas, toutefois les β-lipoprotéines de densité 1,019 portent moins de sites Pg que les β-lipoprotéines de densité 1,006 et 1,063. D'autre part, si l'on soumet des β-lipoprotéines de densité 1,019 provenant d'un sérum normal à jeun, à une extraction éther-méthanol à 6 %, on extrait autant de fraction inhibitrice que si l'on soumet une même quantité de β-lipoprotéine de densité 1,063 au même type d'extraction. Ceci permet de supposer que dans les β-lipoprotéines de densité 1,019 des sujets normaux à jeun, le site Pg existe mais se trouve masqué.

On sait aussi qu'il existe dans la β-lipoprotéine totale une fraction inhibitrice facilement extractible par l'éther seul et une fraction inhibitrice extractible seulement par l'éther-méthanol.

Donc si l'on admet, comme certains auteurs (109, 110, 111, 112), qu'il y a une évolution des β-lipoprotéines légères vers les β-lipoprotéines de densité plus élevée, on peut imaginer que chez des sujets normaux à jeun, à la surface des β-lipoprotéines de densité 1,006, il existe des phospholipides inhibiteurs. Ces phospholipides disparaissent au cours du passage des β-lipoprotéines 1,006 aux β-lipoprotéines 1,019 qui sont entourées de lipides non inhibiteurs, endogènes, normalement transportés par les β-lipoprotéines de densité 1,019 à jeun. Puis au cours du passage des β-lipoprotéines de densité 1,019 aux β-lipoprotéines de densité 1,063, ces lipides disparaissent à leur tour et font apparaitre des phospholipides inhibiteurs, masqués jusqu'alors par les autres lipides (Fig. 34).

...

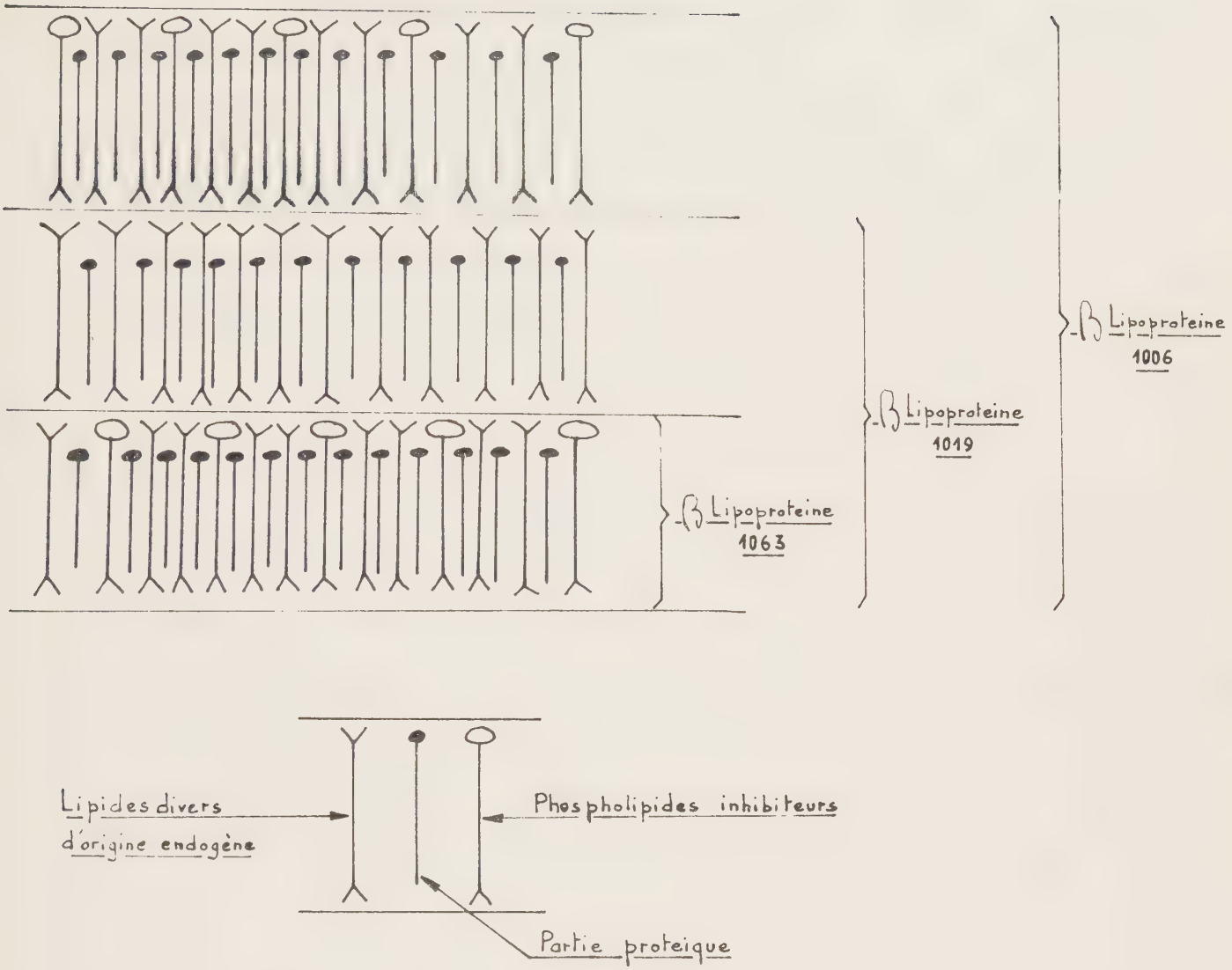


Fig. 34 : Schéma hypothétique représentant la distribution des phospholipides inhibiteurs dans les différentes classes de beta-lipoprotéines.

Ceci permet donc d'expliquer, d'une part, le fait que les β-lipoprotéines de densité 1,019 ne portent apparemment pas de sites Pg et, d'autre part, qu'il existe deux types de fractions inhibitrices sur les β-lipoprotéines :

- l'une, facilement extractible par l'éther (celle qui est à la surface des β-lipoprotéines de densité 1,006, mais qui manque à la surface des β-lipoprotéines de densité 1,019) ;

- l'autre, extractible seulement par l'éther-méthanol (celle qui est contenue dans les β-lipoprotéines de toutes densités y inclus 1,019).

Chez les sujets normaux en période post-prandiale, les β-lipoprotéines de densité 1,006 sont abondantes et il existe de nombreux stades de passage entre les β-lipoprotéines de densité 1,006 et 1,019, que l'on isole en faisant une ultracentrifugation à une densité de 1,019. Certaines de ces formes de passage portent encore en surface des phospholipides inhibiteurs. Le même état est reproduit chez les sujets xanthomateux, même à jeun, car ceux-ci présentent une anomalie du métabolisme des lipoprotéines.

CHAPITRE IX : COMMENTAIRES

Dans ce travail, nous avons essayé de mettre en évidence la nature, les caractéristiques physico-chimiques et la variabilité d'un déterminant lipoprotéique, le site Pg, qui réagit avec la protéine de deux cas d'IgA myélomes avec hyperlipidémie.

Nous avons donc dû tout d'abord préciser la nature et la spécificité des immunoglobulines myélomateuses anti-Pg.

1° Les immunoglobulines anti-lipoprotéines

Seulement quelques cas d'immunoglobulines anti-lipoprotéines ont été décrits jusqu'à présent :

- 1'IgA κ GER... en 1966 par BEAUMONT (44) ;
- une IgM en 1966 par LEWIS (113) ;
- 1'IgA κ SOR... en 1967 par BEAUMONT (45) ;
- 1'IgG Al.Sa. en 1969 par BEAUMONT (46) ;
- une IgA κ en 1971 par NOSEDA (48) ;
- plusieurs IgG et IgM en 1972 par NOSEDA (114) ;
- plusieurs IgM en 1972 par BEAUMONT (115).

Ce sont les deux molécules d'IgA κ décrites par BEAUMONT qui ont fait l'objet de nos propres recherches.

2° La nature de l'activité spécifique anti-lipoprotéines :

Les deux immunoglobulines étudiées ont une activité spécifique semblable à celle d'auto-anticorps, qui s'adresse à un site commun aux α et aux β-lipoprotéines sériques, le site Pg. Il s'agit d'une activité de type

...

anticorps, car après purification, ces immunoglobulines sont douées d'une activité à la fois spécifique et considérable et sont aussi actives, sinon plus, que les meilleurs anticorps connus. Cette activité est portée par le fragment Fab. Les IgA GER... et SOR... répondent donc aux critères de nature, d'activité et de spécificité exigés pour un anticorps. Elles s'inscrivent à ce titre dans la série de plus en plus longue des anticorps monoclonaux. Elles s'accompagnent d'une hyperlipidémie, contrairement à l'IgA χ décrite par NOSEDA, qui s'accompagne d'une hypolipidémie.

Dans les cas GER... et SOR..., nous avons réussi à mettre en évidence l'activité anti-Pg des immunoglobulines myélomateuses, mais cette activité spécifique a pu dans d'autres cas échapper aux investigations pour des raisons techniques. En effet, comme nous l'avons vu dans les cas GER... et SOR..., l'absence d'anticorps libres et la présence de complexes dans le sérum, peuvent rendre didficile la mise en évidence de l'anticorps. D'autre part, l'anticorps peut être précipitant ou non précipitant. Dans le cas GER..., par exemple, l'activité précipitante est considérable. Dans le cas SOR..., elle est faible et serait certainement passée inaperçue en l'absence des connaissances acquises grâce à l'étude du premier cas. Si l'on en juge d'après les résultats des filtrations sur Séphadex et des électrophorèses en gel d'amidon, la différence d'activité précipitante des deux anticorps tient seulement à une polymérisation plus ou moins marquée des molécules de l'anticorps, sans que pour autant l'activité spécifique du monomère et celle des polymères soient différentes. Il s'agit très probablement d'anticorps divalents, mais monospécifiques et qui ont un nombre réduit de points d'accrochage sur la molécule de ζ ou d'α -

...

lipoprotéine et dont le pouvoir précipitant est très sensible au degré de polymérisation.

3° La nature du site antigénique Pg :

Le site Pg diffère des sites lipoprotéiques déjà décrits et connus. En effet, il ne s'agit ni d'un site hétéro-spécifique comme ceux étudiés par BAUER (116, 117), ni de ceux étudiés par BURSTEIN et FINE chez les lapins (118, 119). Dans ce cas, un immunsérum monospécifique réagit avec l'antigène homologue, mais aussi avec des antigènes hétérologues, car il y a dans l'immunsérum des anticorps dirigés contre les sites antigéniques propres à l'espèce qui a servi à l'immunisation, et des anticorps dirigés contre des sites antigéniques communs à plusieurs espèces.

Dans le cas du site Pg, les sérums de lapin anti-β-lipoprotéines humaines ne reconnaissent pas cette spécificité.

Il ne s'agit pas non plus d'un site iso-spécifique, car les β-lipoprotéines des divers hommes et animaux étudiés sont précipitées par le sérum contenant l'IgA myélomateuse. Nous ne sommes pas non plus en présence d'un site allotypique comme les sites décrits par ALLISON et BLUMBERG, BERG, CONTU, HIRSCHFELD (64 à 76).

Le site Pg diffère aussi des sites lipoprotéiques monoclonaux connus. En effet :

- le site Lp Al.Sa. (46) est présent chez moins de 5 % des hommes, mais absent chez les animaux ;

- le site lipoprotéique reconnu par l'IgA décrite par NOSEDA (48) est seulement protéique et n'existe que sur les β-lipoprotéines humaines ;

...

- les sites réagissant avec les IgM monoclonales décrites par BEAUMONT (109) ne sont présents que sur les lipoprotéines humaines.

Le site Pg est un site lipidique, contenant principalement un phospholipide ayant un Rf identique à celui de la sphingomyéline et un petit peptide Des expériences d'extraction par l'alcool-éther à - 20° C, ainsi que des expériences de digestion enzymatique par des protéases, permettent de penser que le peptide ne joue pas de rôle dans le pouvoir inhibiteur du site Pg.

C'est un site commun aux α et aux β-lipoprotéines.

4° Conséquences de la connaissance du site Pg :

L'existence de cette spécificité nouvelle montre que les lipoprotéines du sérum humain possèdent, comme l'albumine étudiée par LAPRESLE (101), plusieurs sortes de groupements spécifiques et que les α et les β-lipoprotéines ont au moins un groupement spécifique commun, dont l'origine doit remonter à une étape de la phylogénèse, très antérieure à celle de la différenciation de l'espèce humaine. Ce groupement pourrait être un fragment d'une matrice commune à ces deux protéines, auquel les groupements isotypiques et allotypiques se sont ajoutés ensuite. Il s'agit donc d'une spécificité phylotypique.

D'autre part, le site Pg est présent sur toutes les β-lipoprotéines, mais le fait qu'il soit masqué dans les β-lipoprotéines de densité 1,019 chez les sujets normaux à jeun, permet de faire deux hypothèses :

a) Les lipoprotéines de densité 1,019 sont, à jeun, chargées de lipides endogènes qui masquent le site Pg alors que les mêmes lipoprotéines après repas, sont chargées de sites Pg réactifs, et ceci modifie la structure de surface de ces lipoprotéines.

...

b) ou bien :

- chez le sujet normal, il existe deux sortes de lipoprotéines de densité 1,019 : les unes d'origine exogène, post-prandiales, ont le site Pg à leur surface ; les autres, d'origine endogène, ne portent pas de sites Pg en surface.

- chez le sujet xanthomateux, il y a une seule variété de β-lipoprotéines de densité 1,019. La lipoprotéine d'origine endogène est absente. Ou bien, il y a les deux variétés de lipoprotéines 1,019, mais la lipoprotéine d'origine endogène a les mêmes caractéristiques Pg que la lipoprotéine d'origine exogène.

BIBLIOGRAPHIE

1. KABAT E. A. - "Blood Group Substances" 1 vol., Academic Press, New York 1956.

2. KABAT E. A. and LESKOWITZ S. - Immunochemical studies on blood groups. XVII. Structural units involved in blood group A and B specificity. J. of the AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1955, 77, 5159.

3. KABAT E. A. and SCHIFFMAN G. - Immunochemical studies on blood groups. XXVIII. Further studies on the oligosaccharide determinants of blood groups B and BP1 specificity.
J. of IMMUNOLOGY, 1962, 88, 782.

4. LLOYD K. O., BEYCHOK S. and KABAT E. A. - Immunochemical studies on blood groups. XXXIX. Optical rotary dispersion and circular dichroism spectra of oligosaccharides from blood-group Lewis^a substance.
BIOCHEMISTRY, 1968, 7, 3762.

5. LLOYD K. O., KABAT E. A. and LICERIO E. - Immunochemical studies on blood groups. XXXVIII. Structure and activities of oligosaccharides produced by alkaline degradation of blood-group Lewis substance. Proposed structure of the carbohydrate chains of human blood group A, B, H, Le^a and Le^b substances.
BIOCHEMISTRY, 1968, 7, 2976.

6. LLOYD K. O. and KABAT E. A. - Immunochemical studies on blood groups. XXXVI. The nature of the unsatured residue in some oligosaccharides produced by the action of sodium hydroxide-sodium borohydride on blood group A, B and H substances.
CARBOHYDRATE RESEARCH, 1967, 4, 165.

7. WATKINS W. M., ZARNITZ M. L. and KABAT E. A. - Development of H activity by human blood-group B substance treated with coffee bean alpha-galactosidase.
NATURE, 1962, 195, 1204.

...

8. SCHIFFMAN G., KABAT E. A. and THOMPSON W. - Immunochemical studies on blood groups. XXX. Cleavage of A, B and H blood-group substance by alkali.
BIOCHEMISTRY, 1964, 3, 113.

9. BALDO B. A. - "Immunological studies on the ABO blood group system" Thèse, Adelaïde, 1970.

10. RACE R. R. and SANGER R. - "Blood groups in man" 1 vol. p. 50, 5th ed., Blackwell, Oxford, 1968.

11. WATKINS W.M. and MORGAN W. T. J. - Further observations on the inhibition of blood-group specific serological reactions by simple sugars of known structure.
VOX SANGUINIS, 1962, 7, 129.

12. LINCOLN P. J. - "Antigen-antibody studies in the ABO blood group system". Ph.D. Thesis, London University, 1967.

13. BURNET M. F. - The impact on ideas of immunology.
Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 1967.

14. WALDENSTROM J.
Harvey Lectures, Academic Press, New York, 1961.

15. KABAT E. A. - In "Serological and biochemical comparisons of proteins" p.92 W. H. Cole edit., Rutgers University Press, New Brunswick, N.J., 1958.

16. TISELIUS A. and KABAT E. A. - An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations.
J. of EXPERIMENTAL MEDICINE, 1939, 69, 119.

17. FLEISCHMAN J. B., PORTER R. R. and PRESS E. M. - The arrangement of the peptide chains in gamma-globulins.
BIOCHEMICAL JOURNAL, 1963, 88, 220.

18. EDELMAN G. M. and GALLY J. A. - A model for the 7 S antibody molecule.
PROC. of the NATIONAL ACADEMY of SCIENCES of USA, 1964, 51, 846.

19. NISONOFF A. and THORBECKE G. J. - The nature of the immune globulins.
ANN. REV. BIOCHEMISTRY, 1964, 33, 355.

20. KUNKEL H. G.
Harvey Lectures, Ser. 59, 1965, p. 219.

...

21. ROWE D. S. and FAHEY J.L. - A new class of human immunoglobulins. II. Normal serum IgD.
J. of EXPERIMENTAL MEDICINE, 1965, 121, 185.

22. MANNIK M. and KUNKEL H. G. - Classification of myeloma proteins, Bence Jones proteins and macroglobulins into two groups on the basis of common antigenic characters.
J. of EXPERIMENTAL MEDICINE, 1962, 116, 859.

23. MIGITA S. and PUTNAM F. W. - Antigenic relationships of Bence Jones proteins myeloma globulins and normal human gamma-globulins.
J. of EXPERIMENTAL MEDICINE, 1963. 117, 81.

24. HILSCHMANN N. and CRAIG L. C. - Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins.
PROC. NATIONAL ACADEMY of SCIENCES of USA, 1965, 53, 1403.

25. PUTNAM F. W., TITANI K. and WHITLEY E. J. Jr - Chemical structure of light chains : amino-acid sequence of type kappa Bence Jones proteins.
PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY, Ser. B, 1966, 166, 124.

26. HILL R. L., DELANEY R., FELLOWS R. E. and LEBOVITZ H. E. - The evolutionary origins of the immunoglobulins.
PROC. of the NATIONAL ACADEMY of SCIENCES of USA, 1966, 56, 1762.

27. COHEN S. - Heterogeneity of immunoglobulin ligth chains.In"Gamma-globulins" 1 vol, Johan Killander edit., Almquist and Wiksell, Uppsala, 1967, p.21

28. EDELMAN G. M. - Studies on the primary and tertiary structure of gamma-G-immunoglobulin. In "Gamma-Globulins" 1 vol., Johan Killander edit., Almquist and Wiksell, Uppsala, 1967, p. 89.

29. PUTNAM F. W. - Structural evolution of kappa and lambda light chains.
Ibidem, p. 45.

30. PORTER R. R. - The chemical structure of the heavy chain of immunoglobulins.
Ibidem, p. 81.

31. PORTER R. R. - The hydrolysis of rabbit gamma-globulins and antibodies with crystallin papain.
BIOCHEMICAL JOURNAL, 1959, 73, 119.

...

32. GRABAR P. - Formation d'auto-anticorps et leurs activités.
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR, 1970, 118, 493.

33. KRITZMANN J., KUNKEL H. G., McCARTHY J., MELLORS R. C. - Studies of a Waldenström type macroglobulin with rheumatoid properties.
J. OF LABORATORY & CLINICAL MEDICINE, 1961, 57, 905.

34. POTTER M., LIEBERMANN R., WOOD L. and McKEAN D. J. - Structural and serological proteins from BALB/C mice that bind phosphorylcholine.
FEDERATION PROCEEDINGS, 1970, 29, 437.

35. WALDENSTROM J., WINBLAD S., HALLEN J. and LIUNGMAN S. - The occurrence of serological "antibody" reagins or similar gamma-globulins in conditions with monoclonal macroglobulinemia, etc.
ACTA MEDICA SCANDINAVICA, 1964, 176, 619.

36. RIVA G. - "Das Serum Eiweissbild", 1vol., Hans Huber Verlag, Berne, 1957.

37. OSSERMAN E. F. - Multiple myeloma. In 'The immunological system in man", Lae and Febiger, New York, 1965, p. 353.

38. KUNKEL H. G. - Myeloma proteins and antibodies.
AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, 1965, 30, 1.

39. METZGER J., POTTER M. and TERRY W. - Summary of workshops on homogenous immunoglobulins with binding activity.
IMMUNOCHEMISTRY, 1969, 6, 831.

40. WALDENSTROM J. - 'Macroglobulinemia in the immunological system in man". 1 vol., Lae and Febiger, New York, 1965.

41. ROCHANT H., THONTHAT H., ETIEVANT M. F., INTRATOR L., SYLVESTRE R. et DREYFUS B. - Lambda cold agglutinin with anti-A_1-specificity in a patient with reticulosarcoma.
VOX SANGUINIS, 1972, 22, 45.

42. DE BOISSEZON J. F., MARTY Y., BIERNE R. et DUCOS J. - Auto-anticorps anti-IgM d'aspect monoclonal.
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR, 1970, 119, 580.

...

43. CASTALDI P. A. and PENNY R. - A macroglobulin with inhibitory activity against factor VIII.
BLOOD, 1970, 35, 370.

44. BEAUMONT J. L. - Une gammaAglobuline de myélome douée d'une activité spécifique anti-lipoprotéines. L'autoanticorps anti-Pg.
COMPTES-RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES de PARIS, Série D, 1966, 263, 2046.

45. BEAUMONT J. L., AUBERT L., ARROYO H., DETOLLE D., JACOTOT B. et BEAUMONT J. L. - Un deuxième cas d'hyperlipidémie par auto-anticorps anti-lipoprotéines chez un sujet atteint de myélome IgA avec xanthomatose.
Société Française d'Hématologie, 20 mars 1967. Abstract in LA PRESSE MEDICALE, 1967, 75, 1266.

46. BEAUMONT J. L. - Un deuxième type d'auto-anticorps anti-lipoprotéines de myélome : l'IgG anti-Lp A1.Sa.
COMPTES-RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES de PARIS, Série D, 1969, 269, 107.

47. BEAUMONT J. L., BEAUMONT V., ANTONUCCI M. et LEMORT N. - Les auto-anticorps anti-lipoprotéines de myélome. Etude comparée de deux types : l'IgA anti-Lp Pg et l'IgG anti-Lp A.S.
ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE, 1970, 28, 387.

48. NOSEDA G., BUTLER R., SCHLUMPF E., BRUNNER E. und RIESEN W. - Bindung von beta-Lipoprotein durch ein IgA Paraprotein : eine Antigen-Antikörper Reaktion ?
SCHWEIZERISCHE MEDIZINISCHE WOCHENSCHRIFT, 1971, 101, 893.

49. LEON M. A. and MARTIN YOUNG N. - Six mouse IgA myeloma proteins with phosphorylcholine specificity.
FEDERATION PROCEEDINGS, 1970, 29, 437.

50. VOISIN G. A. - Naissance et signification du phénomène auto-immunitaire.
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR, 1970, 118, 403.

...

51. BURNET M. F. - "The clonal selection theory of antibody production." 1 vol., Oxford University Press, Londres, 1959.

52. POLONOVSKI J. - Rôle des protéines plasmatiques dans le transport des lipides.
ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE, 1967, 25, 329.

53. LANGER T., STROBER W. and LEVY R. I. - The metabolism of plasma lipoproteins In "Plasma protein metabolism", 1 vol., M.A. Rothschild and T. Waldmann edit., p. 483, Academic Press, New York,

54. MACHEBOEUF M. - Recherches sur les lipides, les stérols et les lipoprotéines du sérum et du plasma sanguin.
Thèse de Sciences, Paris, 1929.

55. BROWN W. V., LEVY R.I. and FREDRICKSON D. S. - Studies on the proteins in human plasma very low density lipoproteins.
J. OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1969, 244, 5687.

56. SHORE B. and SHORE V. - Isolation and characterization of polypeptides of BIOCHEMISTRY, 1969, 8, 4510. human serum lipoproteins.

57. ONCLEY J. L., GURD F. R. N. and MELIN N.
PROC. NATIONAL ACADEMY OF SICENCES of USA, 1950, 72, 458.

58. POLLARD H., SCANU A. M. and TAYLOR E.W. - On the geometrical arrangement of the protein subunits of human low density lipoprotein : evidence for a dodecahedral model.
PROC. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES of USA, 1969, 64, 304.

59. POLLARD H. B. and DEVI S. K. - Construction of three dimensional isodensity map of the low density lipoprotein particule from human serum.
BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1971, 44, 593.

60. MATEU L., TARDIEU A., LUZZATI V., AGGERBECK L. and SCANU A. M. - On the structure of human serum low density lipoproteins.
J. OF MOLECULAR BIOLOGY, 1972, 70, 105.

...

61. TRIA E. and SCANU A. M. -"Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems." 1 vol., Academic Press, London, 1969.

62. SMITHIES D. - Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults.
BIOCHEMICAL JOURNAL, 1955, 61, 629.

63. GRUBB R. and LAURELL A. B. - Hereditary serological human serum groups.
ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA SCANDINAVICA, 1956, 39, 390.

64. ALLISON A. C. and BLUMBERG B. S. - An isoprecipitation reaction distinguishing human serum protein types.
THE LANCET, 1961, 1, 634.

65. BERG K. - A new serum type system in man. The Ld system.
ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA SCANDINAVICA, 1963, 62, 276.

66. CONTU L. - Un nouvel antigène des beta-lipoprotéines humaines.
NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, 1966, 6, 671.

67. CONTU L. - A new inherited serum beta-lipoprotein antigen in man and its relation to the Ag(xy) system.
VOX SANGUINIS, 1968, 15, 367.

68. BERG K. and BEAN A. G. - Antibodies to inherited beta-lipoprotein antigens in the serum of multiply transfused patients.
CLINICAL GENETICS, 1970, 1, 104.

69. HIRSCHFELD J., BLUMBERG B.S. and ALLISON A. C. - Relationship of human anti-lipoprotein allotypic sera.
NATURE, 1964, 202, 706.

70. HIRSCHFELD J., CONTU L., RITTNER C. and GESERICK G. - Inheritance of the Ag(x) and Ag(y) antigens.
VOX SANGUINIS, 1968, 14, 124.

71. HIRSCHFELD J. and OKONI K. - Distribution of Ag(x) and Ag(y) antigens in some populations.
VOX SANGUINIS, 1967, 12, 1.

...

72. HIRSCHFELD J. and RITTNER C. - Inheritance of the Ag(x), Ag (y), (a_1) and Ag(z) antigens.
VOX SANGUINIS, 1969, 16, 146.

73. HIRSCHFELD J. and BUNDSCHUH - Relation between anti-Ag(b) and anti-Ag(t) reagents.
VOX SANGUINIS, 1967, 13, 21.

74. BLUMBERG B. S. and RIDELL N. M. - Inherited antigenic differences in human serum beta-lipoproteins. A second antiserum.
J. OF CLINICAL INVESTIGATION, 1963, 42, 867.

75. BLUMBERG B.S., ALTER H.J., RIDDELL and. and ERLANDSON M. - Multiple antigenic specificities of serum lipoproteins detected with sera of transfused patients.
VOX SANGUINIS, 1964, 128, 9.

76. BLUMBERG B. S., DRAY S., and ROBINSON J. C. - Antigen polymorphism of a low-density beta-lipoprotein. Allotypy in human serum.
NATURE, 1962, 19, 656.

77. BEAUMONT J. L. et LORENZELLI L. - L'auto-anticorps antilipoprotéine (anti-Pg) du gamma-A-myélome avec hyperlipidémie : méthode d'isolement et de purification à partir des complexes circulants.
ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE, 1967, 25, 655.

78. BEAUMONT J. L., LORENZELLI L. et DELPLANQUE B. - Emploi d'un détergent pour la purification d'anticorps anti-lipoprotéines.
IMMUNOCHEMISTRY, 1969, 7, 131.

79. HAVEL R. J., EDER M. A. and BRAGDON J. H. - The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.
J. OF CLINICAL INVESTIGATION, 1955, 34, 1345.

80. SOBER H. A. and PETERSON E. - Protein chromatography on ion exchange cellulose.
FEDERATION PROCEEDINGS, 1965, 17, 1116.

...

81. ANDREWS P. - Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration.
BIOCHEMICAL JOURNAL, 1964, 91, 222.

82. POULLIN M. F., VILAIN C., BEAUMONT J. L. - Une méthode de purification des beta-lipoprotéines.
ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE, 1967, 25, 645.

83. J. L. BEAUMONT et LEMORT N. - Purification de l'alpha-1-lipoprotéine du sérum.
ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE, 1969, 27, 237.

84. NOBLE R. P. - Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel.
J. OF LIPID RESEARCH, 1968, 9, 693.

85. SMITHIES O. - An improved procedure for starch gel electrophoresis, further variations in the serum proteins of normal individues.
BIOCHEMICAL JOURNAL, 1959, 71, 585.

86. NGUYEN TRONG THU, ARDRY R. - Ultra-microméthode d'immuno-électrophorèse.
ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE, 1959, 17, 619.

87. GRABAR P., WILLIAMS C. A. - Méthodes permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines.
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 1953, 10, 193.

88. OUCHTERLONY O. - Diffusion gel methods for immunological analysis.
ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA SCANDINAVICA, 1957, 32, 231.

89. HALPERN B. N., JACOB M., BINAGHI R. et PARLEBAS J. - Mise en évidence et dosage des anticorps anti-allergiques par l'hémagglutination in vitro dans les syndromes allergiques humains et expérimentaux.
REVUE FRANCAISE D'ALLERGIE, 1961, 4, 201.

90. BEAUMONT J. L., BAUDET M. F., DELPLANQUE B. et PERON F. - L'hémagglutination passive au chlorure de chrome. Son emploi sans diluant macromoléculaire.
PATHOLOGIE ET BIOLOGIE, 1969, 17, 429.

...

91. GOLD E. R., FUDENBERG H. H. - Chromic chloride a coupling reagent for passive hemagglutination reactions.
J. OF IMMUNOLOGY, 1967, 99, 859.

92. BEAUMONT J. L. et LORENZELLI L. - Le phénomène d'agglutination des particules lipidiques. Son intérêt en séro-immunologie.
PATHOLOGIE ET BIOLOGIE, 1972, 20, 357.

93. LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. - Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1951, 193, 265.

94. HARDY W. B. and GARDINER S. - Proteins of blood plasma.
PROCEEDINGS OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY, 1910, 40, 68.

95. FISKE C. H. and SUBBAROW Y. - The colorimetric determination of phosphorus
J. OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1925, 66, 375.

96. FERRO P. et HAM A. - Rapid determination of total and free cholesterol in serum.
AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, 1960, 33, 545.

97. AYRAULT-JARRIER M. - Action des détergents sur une beta-lipoprotéine isolée du sérum humain.
Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris, 1959.

98. AYRAULT-JARRIER M., WALD R. et POLONOVSKI J. - Action des détergents sur une alpha-lipoprotéine sérique humaine. I. Etude de la mobilité électrophorétique.
BULLETIN DE LA SOCIETE DE CHIMIE BIOLOGIQUE, 1963, 45, 361.

99. BURSTEIN M. - Précipitation sélective des lipoprotéines sériques de faible densité par l'héparine en présence de chlorure de magnésium et de saccharose.
COMPTES-RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES,de PARIS, Série D, 1962, 255, 605.

100. OUDIN J. - L'allotypie de certaines protéines du sérum.
BULLETIN DE LA SOCIETE DE CHIMIE BIOLOGIQUE, 1964, 46, 1711.

...

101. LAPRESLE C. - Etude de la dégradation de la sérum albumine humaine par un extrait de rate de lapin. II. Mise en évidence de trois groupements spécifiques différents dans le motif antigénique de l'albumine humaine et de trois anticorps correspondants dans le sérum de lapin anti-albumine humaine.
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR, 1955, 89, 654.

102. KABAT E. A. and MAYER M. M. - In "Experimental Immunochemistry", 1 vol. C. C. THOMAS, Springfield, 1964, pp. 127-128 et 241-265.

103. FOLCH, LEES M. and SLOANE-STANLEY G. H. - A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1957, 226, 497.

104. DAVIS B.D., MOORE D. H., KABAT E. A. and HARRIS A. - Electrophoretic, ultracentrifugal and immunochemical studies on Wassermann antibody.
J. OF IMMUNOLOGY, 1945, 50, 1.

105. CLARKE D. H. and CAZALS J. - Technique for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses.
THE AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE & HYGIENE, 1958, 7, 561.

106. AYRAULT-JARRIER M. - Communication personnelle de l'auteur.

107. BOYNS A. R . and HARDWICKE J. - The isolation of soluble antigen-antibody complexes on Sephadex G 200.
IMMUNOLOGY, 1966, 10, 57.

108. FLEISCHMAN J.B., PAIN R. H., PORTER R. R. - Reduction of gamma-globulins.
ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 1962, Supp. 1, 174.

109. GOTTO A. M., BROWN W. V., LEVY R. I., M. E. BIRNBAUMER and FREDRICKSON D. S. - Evidence for the identity of the major apoprotein in low density and very low density lipoproteins in normal subjects and patients with familial hyperlipoproteinemia.
THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 1972, 51, 1486.

110. GITLIN D., CORNWELL D. G., NAKASATO D., ONCLEY J. L., HUGHES W. L. Jr and JANEWAY C. A. - Studies on the metabolism of plasma proteins in the nephrotic syndrome. II. The lipoproteins.
J. OF CLINICAL INVESTIGATION, 1958, 37, 172.

...

111. BILHEIMER D., EISENVERG S. and LEVY RII. - Human plasma very low density lipoprotein (VLDL)metabolism.
J. OF CLINICAL INVESTIGATION, 1971, 50, 8a.

112. NICHOLS A. V., STRISOWER E. H., LINDGREN F. T., ADAMSON G. L. and COGGIOLA E. L. - Analysis of change in ultracentrifugal lipoprotein profiles following heparin and ethyl p-chlorophenoxy-isobutyrate administration.
CLINICA CHIMICA ACTA, 1968, 20, 277.

113. LEWIS L. A., VAN ORDER R. A., PAGE I. H. - Association of cold precipitability with the beta-lipoprotein and cryoglobulin.
AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, 1966, 40, 785.

114. RIESEN W., NOSEDA G. and BUTLER R. - Anti-beta-lipoprotein activity of human monoclonal immunoglobulins.
VOX SANGUINIS, 1972, 22, 420.

115. BEAUMONT J. L., LORENZELLI L. et ANTONUCCI M. - Activité anti-lipoprotéine et anti-émulsions d'IgM monoclonales. Une série d'anticorps spécifiques anti-émulsifiants.
A paraitre in PATHOLOGIE ET BIOLOGIE

116. BAUER K. - Cross reactions between human and animal plasma proteins.
Part I. : HUMAN GENETIK, 1970, 8, 325
Part II. : " " " 10, 1
Part III. : " " " 10, 8.

117. BAUER K. - Heterologue Reaktionen von Sängetierenseren mit monospezifischen Antihumanseren.
HUMAN GENETIK, 1969, 7, 76.

118. BURSTEIN M. et FINE J. M. - Analyse immunochimique des motifs antigéniques communs aux beta-lipoprotéines des mammifères.
REVUE FRANCAISE DE TRANSFUSION, 1971, 14, 361.

119. BURSTEIN M. et FINE J. M. - Isolement de l'anticorps anti-beta-lipoprotéines.
Sixth International Congress on Biochemistry, New York, 1964, 2, 143.